DIE DIFFERENZIERUNG DER SYMBIOSE VON GLYCINE MAX UND RHIZOBIUM JAPONICUM

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
im
Fachbereich Biologie
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von

RAINER STRIPF

aus Bad Bergzabern

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

DIE DIFFERENZIERUNG DER SYMBIOSE VON GLYCINE MAX UND RHIZOBIUM JAPONICUM

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
im
Fachbereich Biologie
der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von

RAINER STRIPF

aus Bad Bergzabern

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von dem Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn als Dissertation angenommen am 12.12.1978.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 12. 1978

Berichterstatter: Prof. Dr. Dietrich Werner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Horst Senger

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546010_0037

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

WERNER, D. and R. STRIPF: Differentiation of Rhizobium japonicum. I. Enzymatic comparison of nitrogenase repressed and derepressed free living cells and of bacteroids. Z. Naturforsch. 33c, 245 - 252 (1978).

STRIPF, R. and D. WERNER: Differentiation of Rhizobium japonicum. II. Enzymatic activities in bacteroids and plant cytoplasm during the development of nodules of Glycine max. Z. Naturforsch. 33c, 373 - 381 (1978).

STRIPF, R. und D. WERNER: Enzymatische Differenzierung der Symbiose von Glycine max und Rhizobium japonicum mit effektiven und ineffektiven Stämmen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. (im Druck).

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 5

2. 1. Anzucht von Rhizobium japonicum 5

2. 2. Anzucht von Glycine max 7

2. 3. Infektion von Glycine max und Ernte der Knöllchen 8

2. 4. Mikrobiologische Kontrolltests 9

2. 5. Isolierung der Bakteroiden 10

2. 6. Herstellung zellfreier Extrakte 11

2.6.1. Herstellung zellfreier Extrakte von Bakteroiden und von Knöllchenzellen 11

2.6.2. Herstellung zellfreier Extrakte von freilebenden Bakterien und pflanzlichem nichtinfiziertem Wurzelgewege 11

2. 7. Aktivitätsbestimmungen der Enzyme 12

2.7.1. Aktivitätsbestimmung der Nitrogenase 12

2.7.2. Aktivitätsbestimmung der Aspartat-Aminotransferase, Alanin-Aminotransferase, Glutamat-Dehydrogenase, Alanin-Dehydrogenase, 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, Glutamat-Synthase und Glutamin-Synthetase 13

2. 8. Bestimmung des Leghämoglobingehalts 22

2. 9. Spektroskopie von pflanzlichem Cytoplasma einschließlich Vesikelinhalt 22

2.10. Proteinbestimmungen 22

2.11. Bestimmung des Frischgewichts und des Trockengewichts 30

2.12. Bestimmung des C-, H- und N-Gehalts 30

2.13. Elektronenmikroskopische Aufnahmen 30

Seite

3. ERGEBNISSE 31

3.1. Charakterisierung der Soja-Sorten (Mandarin, Caloria, Chippewa 64) 31

3.2. Wachstum effektiver und ineffektiver Knöllchen 31

3.2.1. Knöllchenzahl und -gewicht 31

3.2.2. Fraktionierung der Knöllchen nach Größe 36

3.2.3. Wirkung verschiedener Perlite-Sorten auf das Wachstum 39

3.3. Trockengewichtsanteil, C-, H- und N-Gehalt 42

3.4. Proteingehalt 48

3.5. Nitrogenase-Aktivitäten 51

3.5.1. Abhängigkeit pro Frischgewichtseinheit und pro Pflanze 51

3.5.2. Abhängigkeit von der Tageszeit 55

3.5.3. Abhängigkeit vom O_2-Partialdruck 55

3.6. Leghämoglobingehalt und Absorptionsspektren 56

3.7. Vergleich der Entwicklung spezifischer Aktivitäten von Enzymen im pflanzlichen Cytoplasma und in Bakteroiden von effektiven und ineffektiven Knöllchen 60

3.7.1. Aspartat-Aminotransferase 60

3.7.2. Alanin-Aminotransferase 60

3.7.3. Glutamat-Dehydrogenase 61

3.7.4. Alanin-Dehydrogenase 66

3.7.5. 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase 66

3.7.6. Glutamat-Synthase 69

3.7.7. Glutamin-Synthetase 69

3.7.7.1. Mn^{2+}-abhängiger Transferase-Test 69

3.7.7.2. Biosynthese-Test und Mg^{2+}-abhängiger Transferase-Test 74

3.8. Stabilität der Enzyme im Rohextrakt 76

3.9. Enzymaktivitäten im nichtinfizierten Wurzelgewebe 77

Seite

3.10. Leghämoglobingehalt und Enzymaktivitäten in nach Größe fraktionierten Knöllchen während der Entwicklung 78

3.11. Enzymatischer Vergleich von Nitrogenase-reprimierten und Nitrogenase-dereprimierten freilebenden Rhizobien 86

3.12. Ultrastrukturelle Differenzierung der Knöllchen von Glycine max 87

3.12.1. Effektive Knöllchen 87

3.12.2. Ineffektive Knöllchen 92

4. DISKUSSION 95

4. 1. N_2-Fixierung und Wachstum von Knöllchen: Zusammenhänge und Einflüsse 95

4. 2. Verlauf des Leghämoglobingehalts und der Aktivitäten einiger am N-Stoffwechsel beteiligten Enzyme während der Knöllchenentwicklung - Zusammenhänge mit der ultrastrukturellen Entwicklung - Vergleich der Enzymaktivitäten mit freilebenden Rhizobien 105

5. ZUSAMMENFASSUNG 120

6. LITERATUR 125

ANHANG 145

Elektronenmikroskopische Abbildungen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ADH	Alanin-Dehydrogenase
ALT	Alanin-Aminotransferase (= Glutamat-Pyruvat-Transaminase)
AST	Aspartat-Aminotransferase (= Glutamat-Oxalacetat-Transamina
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOGAT	Glutamine amide 2-oxoglutarate aminotransferase (= Glutamat- Synthase)
GS	Glutamin-Synthetase
3-HBDH	3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase
HEPES	N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N-äthansulfonsäure
Lb	Leghämoglobin
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
MES	Morpholinoäthansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NAD^+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
$NADH+H^+$	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
$NADP^+$	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
$NADPH+H^+$	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
PHBS	Poly-β-Hydroxybuttersäure
TES	N-Tris-(hydroxymethyl)-2-aminoäthansulfonsäure
TRICIN	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
TRIS	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Auf unserer Erde besteht zwischen der Atmosphäre einerseits und der Hydrosphäre und Litosphäre andererseits ein reger Stickstoff-Austausch. BURNS and HARDY (1975) haben geschätzt, daß etwa 400 x 10^6 t N pro Jahr zwischen den beiden Stickstoff-Pools ausgetauscht werden, woran biologische und abiologische Vorgänge beteiligt sind. Durch biologische und abiologische Denitrifikation gehen 215 x 10^6 t und durch Verdunstung und Verbrennung 185 x 10^6 t in die Atmosphäre ein. Die Rückführung des Stickstoffs erfolgt hauptsächlich durch Niederschlag (200 x 10^6 t) und durch die Stickstoffixierung (ca. 220 x 10^6 t), wobei industriell 45,9 x 10^6 t N (im Jahr 1977; Monthly Bulletin of Statistics, 1978) und biologisch 170 x 10^6 t N produziert werden. Unter der biologischen Stickstoffixierung versteht man die Reduktion des molekularen Luftstickstoffs zu NH_4^+ mit Hilfe des Enzyms Nitrogenase.

Die riesigen Reserven atmosphärischen Stickstoffs können durch Mikroorganismen, die entweder frei oder in Symbiose leben, genutzt werden. Wahrscheinlich sind viele zur N_2-Fixierung befähigten Mikroorganismen noch nicht bekannt; alle bisher gefundenen gehören zu den Prokaryonten (Bakterien und Blaualgen).

Von mehreren symbiontischen Systemen ist die Leguminosen-Rhizobien-Symbiose, die zur Knöllchenbildung an den Wurzeln der Pflanzen führt, eine der bedeutsamsten. Man weiß heute, daß etwa 430 Leguminosen-Arten eine Symbiose mit Rhizobien eingehen können (WERNER, 1974). Die Leguminosen sind weltweit verbreitet, und viele Arten werden landwirtschaftlich genutzt. Je nach Wachstumsbedingung und Symbiose-Partner wird geschätzt, daß Luzerne, Klee, Erbsen oder Sojabohnen zwischen 20 und 500 kg N_2 pro ha und Jahr fixieren (VINCENT, 1974).

Die Entwicklung der Symbiose in Wurzelknöllchen von Leguminosen ist eine von mehreren intensiv untersuchten symbiontischen Beziehungen zwischen Mikroorganismen und höheren Pflanzen oder Tieren (MANDELSTAM, 1971). Die Entwicklung der Knöllchen ist geprägt durch eine große Zahl neuer biochemischer Eigenschaften, wie z.B. die Nitrogenase- und Leghämoglobin-Synthese, die von ultrastrukturellen Veränderungen der Symbiose-Partner (DART, 1977) begleitet werden. Die eingehende Beschäftigung mit der Symbiose zwischen Glycine max und Rhizobium japonicum scheint zusätzlich gerechtfertigt, da sie ein Modell für die ersten Schritte darstellt, wie freilebende Prokaryonten im Zuge eines evolutionären Prozesses zu intrazellulären Organellen werden könnten. Das durch die Symbiose entstehende neue Organ, das Knöllchen, ist auch Ausdruck einer Interaktion zwischen Pro- und Eukaryont, ohne deren Wirken die neue biologische Qualität Knöllchen nicht realisiert wird. Die Auslösung dieser Organbildung findet besonderes Interesse, weil das mit Rhizobium eng verwandte Agrobacterium tumefaciens Pflanzenkrebs, also morphologisch nicht reguliertes Organwachstum, auslöst.

Die im folgenden beschriebenen Untersuchungen an Wurzelknöllchen von Glycine max, infiziert mit Rhizobium japonicum sollen getrennt die Entwicklung des pflanzlichen Cytoplasmas und der darin lebenden Bakterien, die sich zu Bakteroiden mit neuen Eigenschaften entwickeln (QUISPEL, 1977), charakterisieren. Diesem Entwicklungsaspekt kommt besondere Bedeutung zu, da sich der überwiegende Teil der bisher erschienenen Veröffentlichungen nur auf z.T. unscharf definiertes Knöllchenmaterial eines bestimmten Alters stützt. Zur Charakterisierung der Knöllchenentwicklung wurden die spezifischen Aktivitäten einiger Enzyme, die wahrscheinlich an der Primärassimilation des durch die bakterielle Nitrogenase gebildeten NH_4^+ zu Aminosäuren beteiligt sind, bestimmt. Der Verlauf der Nitrogenase-Aktivität, das Schlüssel-

enzym der Stickstoffixierung, soll als Grundwert dienen, mit dem die übrigen Enzymaktivitäten verglichen werden können. Mit diesen Ergebnissen soll entschieden werden, wo der fixierte Stickstoff hauptsächlich assimiliert wird und wie sich dies möglicherweise während der Knöllchenentwicklung verändert. Der Verlauf soll zudem eine Aussage darüber gestatten, ob diese Enzyme mit der Nitrogenase-Induktion in der Symbiose korreliert sind. Weiterhin soll untersucht werden, wie sich bestimmte Faktoren wie die Tageszeit und der Sauerstoff-Partialdruck auf die N_2-Fixierungsaktivität, und die Bodenbeschaffenheit auf das Wachstum der Knöllchen auswirken. Neben den Enzymaktivitäten werden noch andere Parameter herangezogen, wie der Leghämoglobin-, Protein-, C-, H- und N-Gehalt, der Trockengewichtsanteil vom Frischgewicht und der Wachstumsverlauf (anhand Knöllchenzahl und -gewicht), um die Entwicklung der Knöllchen noch genauer zu charakterisieren. Inwieweit sich verschiedene Soja-Sorten und Rhizobien-Stämme auf das Enzymmuster auswirken, ist ein weiterer zu untersuchender Aspekt. Nachdem mit diesen Untersuchungen Entwicklungscharakteristika für die Gesamtzahl der Knöllchen einer Pflanze gefunden wurden, soll die Fraktionierung in verschiedene Knöllchengrößen eine Aussage über die Alterung der Knöllchen einer Größe gestatten.

Außerdem soll der Frage nachgegangen werden, wie sich verschiedene Soja-Sorten und die Infektion mit einem Nitrogenase-inaktiven Rhizobienstamm auf die Enzymaktivitäten und den Wachstumsverlauf der Knöllchen auswirken. Weiterhin können die Enzymaktivitäten aus Wurzeln ohne Knöllchen dazu dienen, um aus dem Vergleich das neue biologische Organ Knöllchen, welches aus Wurzelgewebe hervorgeht, zu kennzeichnen. Ein Vergleich der Aktivitäten aus Bakteroiden mit Nitrogenase-reprimierten und -dereprimierten freilebenden Zellen von Rhizobium japonicum ist ein weiteres Versuchsziel. Mit diesen Zellen könnte entschieden werden, welche Veränderungen der Bakteroiden mit einer dereprimierten

Nitrogenase verbunden sind oder welche nur Auswirkungen der Lokalisation der Bakteroiden in den Vesikeln sind. Die Enzyme des N-Stoffwechselssind von besonderem Interesse, da Bakteroiden und freilebende Zellen von Rhizobium möglicherweise unterschiedlichen Regulationsprozessen unterworfen sind (BISHOP et al., 1976). Es können zudem Informationen darüber erhalten werden, ob freilebende N_2-fixierende Rhizobien, bezüglich der gemessenen Enzymaktivitäten, Bakteroiden von Knöllchen mit maximaler Nitrogenase-Aktivität oder eher Bakteroiden anderer Stadien oder sogar funktionell dem pflanzlichen Knöllchen-Cytoplasma ähneln.

Schließlich soll die Entwicklung der effektiven und ineffektiven Knöllchen auch ultrastrukturell verfolgt werden, um eventuell Beziehungen zur physiologischen Entwicklung herzustellen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Anzucht von Rhizobium japonicum

Rhizobium japonicum Stamm 3I1b85 stellte Dr. Weber (USDA, Beltsville, Md.), Stamm 61-A-101 und Stamm 61-A-24 Dr. J.C. Burton (Nitragin Company, Milwaukee, USA) zur Verfügung.

Alle Stämme wurden routinemäßig in einem schwachgepufferten phosphat- und stickstoffarmen Medium (20 E) kultiviert, das Hefeextrakt (Merck, Nr. 3753) und Mannit und Glycerin als Kohlenstoffquellen enthielt (WERNER et al., 1975).

In 1000 ml Medium 20 E waren enthalten:

68	mg	KH_2PO_4
87	mg	K_2HPO_4
370	mg	$MgSo_4 \times 7\ H_2O$
73,5	mg	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$
506	mg	KNO_3
4,84	mg	$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$
6,95	mg	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$ als EDTA-Komplex mit 9,3 mg Na_2-EDTA
4,6	g	Glycerin
1,82	g	Mannit
2,0	g	Hefeextrakt

Der pH war 6,8.

Stammkulturen der Rhizobienstämme wurden regelmäßig alle 4-5 Monate auf Schrägagar (Medium 20 E ohne KNO_3 + 1,2 % (w/v) hochgereinigtem Agar, Merck Nr. 1613) in verschließbaren Reagenzgläsern angelegt.

Um Bakterien für Experimente zu erhalten, wurden 100 ml Medium 20 E in 300 ml Erlenmeyer-Kolben mit einer Einzelkolonie (s. 2.4.) eines bestimmten Stammes beimpft. (Eine Einzelkolonie mit ungefähr 1 - 10 x 10^6 lebenden Zellen wurde von einer Agarplatte abgenommen (Medium 20 E + 1,2 % (w/v) Agar).) Die Flüssigkeitskulturen wuchsen 5 - 7 Tage im Dunklen bei 28° C auf einer Schüttelmaschine (120 Umdrehungen x min^{-1}). Die in der logarithmischen Phase (ermittelt aus Wachstumskurven) befind-

lichen Zellen wurden abzentrifugiert und weiterbehandelt.

Um Nitrogenase-dereprimierte freilebende Zellen zu erhalten, wurde eine aus einer Einzelkolonie von Rhizobium japonicum 61-A-101 gewachsene Kultur in Medium 20 E (nach Erreichen von 700 - 1000 Nephelometer-Einheiten; EEL Nephelometer) abzentrifugiert (38000 x g, 10 min), in 100 ml Wasser resuspendiert und mit 500 ml Nährlösung (genannt 20N), die 1,2 x Medium 20 P-Konzentration enthielt, vermischt, um 600 ml von folgendem Medium 20 P zu erhalten:

In 1000 ml Medium:

308	mg	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	($1{,}25 \times 10^{-3}$ M)
61,25	mg	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	($4{,}16 \times 10^{-4}$ M)
4,033	mg	$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	($1{,}66 \times 10^{-5}$ M)
5,791	mg	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	($2{,}08 \times 10^{-5}$ M)
7,750	mg	Na_2-EDTA zuvor in 1 ml gelöst	($2{,}08 \times 10^{-5}$ M)
3,833	g	Glycerin (=3,04 ml)	($4{,}16 \times 10^{-2}$ M)
1,516	g	Mannit	($8{,}33 \times 10^{-3}$ M)
1,091	g	L-Leucin	($8{,}33 \times 10^{-3}$ M)
0,315	g	D-Arabinose	($2{,}09 \times 10^{-3}$ M)
2,250	g	Na-Succinat x 6 H_2O	($8{,}33 \times 10^{-3}$ M)
5,233	g	$NaH_2PO_4 \times H_2O$	($3{,}80 \times 10^{-2}$ M)
0,652	g	K_2HPO_4	($3{,}74 \times 10^{-3}$ M)
0,550	mg	KJ	($3{,}33 \times 10^{-6}$ M)
0,020	mg	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	($8{,}33 \times 10^{-8}$ M)
0,020	mg	$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	($8{,}33 \times 10^{-8}$ M)
0,239	mg	$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	($8{,}33 \times 10^{-7}$ M)
0,140	mg	$MnSO_4 \times H_2O$	($8{,}28 \times 10^{-7}$ M)
0,508	mg	H_3BO_3	($8{,}33 \times 10^{-6}$ M)
0,228	mg	p-Aminobenzoesäure	($1{,}66 \times 10^{-6}$ M)
0,858	mg	Pyridoxin-HCl	($4{,}16 \times 10^{-6}$ M)
15	mg	meso-Inosit	($8{,}33 \times 10^{-5}$ M)
5,616	mg	Thiamin-HCl	($1{,}66 \times 10^{-5}$ M)

0,791 mg	Calcium-D-Pantothenat	($1{,}66 \times 10^{-6}$ M)
0,608 mg	D(+)-Biotin	($2{,}49 \times 10^{-6}$ M)
1,025 mg	Nicotinsäure	($8{,}33 \times 10^{-6}$ M)
0,941 mg	Riboflavin	($2{,}49 \times 10^{-6}$ M)

pH: 5,8.

Nach 10 - 12 Tagen Wachstum stieg der pH im Medium trotz 42 mM Phosphat-Puffer auf pH 6,8 an. Die Kulturen in 1 l-Flaschen wurden kontinuierlich mit einer Gasmischung von 2 % O_2, 10 % CO_2 und 88 % N_2 (Messer Griesheim, Düsseldorf) und in einer Rate von 12 ml x min^{-1} durchperlt und gleichzeitig auf einem Magnetrührer suspendiert. In 5 bis 12 Tagen nach der Beimpfung hatte die optische Dichte dieser Kulturen um das 2 - 4 fache zugenommen, so daß 300 - 800 Nephelometer-Einheiten gemessen werden konnten, denen 0,35 - 1,0 mg Protein x ml^{-1} entsprachen (WERNER and STRIPF, 1978).

Alle sterilen Arbeiten wurden in der "Reinen Werkbank" mit "Laminar-Flow" (Ceag Schirp Typ C424H, Reinraumtechnik, Bork, Westfalen) durchgeführt.

2.2. Anzucht von Glycine max

Die Samen von Glycine max var. Caloria, var. Mandarin und var. Chippewa 64 (K. Behm GmbH, Hamburg) wurden in einer 1 % (w/v) $CaOCl_2$-Lösung (in sterilem Leitungswasser) an der Oberfläche sterilisiert, mit sterilem Leitungswasser gewaschen und 14 Tage in "Agriperl-Pflanzenperlite" (Perlite Dämmstoff GmbH, Dortmund) angekeimt. (Das poröse Perlite geht aus dem vulkanischen Gestein (Perlit) durch kurzfristiges Erhitzen auf mehr als 1000° C hervor, wobei das entstehende expandierte Naturglas-Granulat im pH-Wert neutral ist. Agriperl-Pflanzenperlite hat ein Raumgewicht von 90 kg x m^{-3} und weist eine Körnung von ca. 0,5 - 5 mm auf.) Während dieses Zeitraumes wurden die Keimlinge mit sterilem Leitungswasser gegossen. Die Pflanzen wuchsen in einer Klimakammer (K. Weiss GmbH, Gießen) mit einem 14 - 10 h Licht-Dunkel-Wechsel, bei 250° C und 75 % Luftfeuchtigkeit während

der Lichtphase (18000 cd x s^{-1} x m^{-2}) und bei 20° C und 75 % Luftfeuchtigkeit während der Dunkelphase.

2.3. Infektion von Glycine max und Ernte der Knöllchen

Die Infektion der Pflanzen erfolgte, indem ihre Wurzeln 10 min in eine Suspension, bestehend aus gleichen Teilen gewaschener (Leitungswasser), sich in der log-Phase befindender Bakterien und 0,15 % (w/v) Agar (Agar Noble, Difco, Detroit) getaucht wurden. Die Rhizobien wurden, ausgehend von einer Einzelkolonie, in Medium 20 E kultiviert. Die infizierten Pflanzen wurden paarweise in einen neuen mit Agriperl-Pflanzenperlite gefüllten Topf gesetzt. (Für bestimmte Experimente wurden andere Perlite-Sorten verwendet: Superlite 0/5, Superlite 0/3 und Superlite 0/1 mit einer Schüttdichte von 90, 80 und 70 kg x m^{-3} und einer Körnung von 0-5, 0-3 und 0-1 mm.) Ab dem dritten Tag nach der Infektion wurde jeden zweiten Tag mit folgender stickstoffreien sterilen Leguminosen-Nährlösung gegossen:

In 1000 ml Medium:

279	mg	K_2SO_4
493	mg	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$
23	mg	KH_2PO_4
145	mg	K_2HPO_4
371	mg	$CaCl_2 \times 2\ H_2O$
1,43	mg	H_3BO_3
1,02	mg	$MnSO_4 \times 4\ H_2O$
0,22	mg	$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$
0,08	mg	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$
0,05	mg	$Na_2MoO_4 \times 4\ H_2O$
0,10	mg	$CoCl_2 \times 4\ H_2O$
16,70	mg	Fe-EDTA-di-o-hydroxyphenylacetat (Geigy Chemicals, Yonkers, N.Y.)

pH: 7,0 (WERNER et al., 1975).

Einmal in der Woche wurden die Pflanzen nur mit sterilem Leitungswasser gegossen. 10 % der Pflanzen eines Versuchs wurden nicht infiziert und dienten als Kontrollen bei den Erntetagen.

Pro Versuchstag wurde das gesamte Wurzelsystem einer Pflanze etwa 4 h nach Beginn der Lichtphase gaschromatographisch auf N_2-Fixierungsaktivität nach dem Acetylen-Äthylen-Reduktionstest (s. 2.7.1.) getestet. Anschließend wurden die Knöllchen abgesammelt, gewogen und, wenn nicht anders erwähnt, bei -80° C eingefroren. Das Einfrieren der Knöllchen auf -80° C hat nach DUNN and KLUCAS (1973) keinen Einfluß auf die Aktivitäten der Enzyme GDH, GS, GOGAT und ADH. Für die GS, ALT und AST konnte diese Aussage hier zusätzlich bekräftigt werden.

Um die Größenverteilung der Knöllchen eines Versuchstages feststellen zu können, wurden die Knöllchen durch ein mehrstufig angeordnetes Siebsystem gesiebt. Dies hatte zum einen den Vorteil, den Zähl- und Wägevorgang zu beschleunigen, und zum anderen, der Austrocknung der Knöllchen vorzubeugen. Folgende Siebstufen-Maschenweiten (µm) wurden eingesetzt (von oben nach unten im Siebapparat): 4000, 3800, 3600, 3300, 3000, 2800, 2600, 2400, 2200 (Monofile Nylon-Schwergewebe; Züricher Beuteltuchfabrik AG) und 2000, 1800, 1600 (Monodur-Polyamid; Vereinigte Seidenwebereien AG, Krefeld).

2.4. Mikrobiologische Kontrolltests

Nach jedem Experiment wurden geeignete Verdünnungsstufen der Bakterien einer Kultur ausplattiert (Medium 20 E + 1,2 % (w/v) Agar) und hinsichtlich Größeneinheitlichkeit der Kolonien und Wachstumsgeschwindigkeit überprüft, wobei die Bakterien von Rhizobium japonicum (langsamwachsend) innerhalb 5 - 7 Tagen 1 - 2 mm große Kolonien entwickeln. Einzelkolonien einiger Platten eines Experiments wurden für Infektionstests an Glycine max var. Caloria eingesetzt. Hierbei wurden pro Platte 4 Einzelkolonien jeweils in 5 ml sterilem Leitungswasser suspendiert und mit 5 ml 0,15 % (w/v) Agar-Lösung (Agar

Noble, Difco; in Leitungswasser) vermischt. In eine Bakteriensuspension (in Zentrifugengefäßen, 12 ml) wurde jeweils eine Pflanze 10 min eingetaucht, in einen Topf mit Agriperl-Pflanzenperlite gesetzt und, wie unter 2.3. beschrieben, weiter behandelt. 10 % der Pflanzen einer Versuchsserie wurden nicht infiziert und dienten als Kontrollen (WERNER, 1976). Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe der Rhizobien-Ausgangskultur (in Leitungswasser) angelegt, um einer bestimmten Verdünnungsstufe die mittlere Knöllchenzahl pro Pflanze zuordnen zu können. Bei einer Stichprobengröße von 10 Pflanzen war die mittlere Knöllchenzahl pro Pflanze, infiziert mit 2×10^4 lebenden Rhizobien: 21, und infiziert mit 3×10^3 lebenden Bakterien: 16.

2.5. Isolierung der Bakteroiden

Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Knöllchen eines Erntetermins (in der Regel von 10 Pflanzen) für eine Fraktionierung eingesetzt. Die Knöllchen wurden kurz mit aqua bidest. bei 4° C gewaschen und anschließend in einem vorgekühlten Mörser mit Pistill in 0,05 M TES-Puffer mit 0,01 M red. Glutathion (pH 7,5 eingestellt mit 1 N NaOH; pH-Meter: Knick, Berlin; Elektrode: Ingold, Frankfurt) aufgenommen, wobei etwa 1 g Frischgewicht 5 ml Puffer zugeordnet wurden. Ein Drittel des Frischgewichts an unlöslichem säuregewaschenem (1 N HCl) Polyvinylpyrrolidon = PVP (Polyclar AT, Serva) wurde hinzugefügt. Die Knöllchen wurden im Mörser zerstoßen (nicht zerrieben[1]) und über 10 µ - Gaze (Vereinigte Seidenwebereien AG, Krefeld) abgesaugt. Die Zellreste wurden nochmals aufgeschlossen. Die Filtrate wurden vereinigt und 4 min bei 300 x g (Christ UJ 1) zentrifugiert, um die meisten Stärkepartikel und große Zellorganellen zu entfernen.

---

[1] Bei reibender Bewegung platzt ein Teil der Bakteroiden, und es lassen sich Aktivitäten rein bakterieller Enzyme wie 3-HBDH und ADH in der pflanzlichen Fraktion nachweisen.

Der Überstand wurde 15 min bei 4500 x g (Beckman J-21 oder MSE, High Speed 18) zentrifugiert, und die sedimentierten Bakteroiden wurden zweimal in 0,05 M TES-Puffer pH 7,5 gewaschen (Resuspension mit IKA-Vibro-Fix, Janke & Kunkel KG, Staufen i. Breisgau). Die so gewaschenen Bakteroiden wurden schließlich in 0,05 M TES-Puffer mit 0,01 M red. Glutathion (pH 7,5) resuspendiert, wobei etwa 2,5 ml Puffer für die effektiven Bakteroiden und 1,2 ml für die ineffektiven Bakteroiden aus 1 g Knöllchen-Frischgewicht eingesetzt wurden. Die Reinheit dieser Suspension intakter gewaschener Bakteroiden wurde im Interferenzkontrast-Mikroskop überprüft.

2.6. Herstellung zellfreier Extrakte

2.6.1. Herstellung zellfreier Extrakte von Bakteroiden und von Knöllchenzellen

Die Bakteroidensuspension (s. 2.5.) wurde zweimal in einer vorgekühlten French-Press-Zelle (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland) bei 20000 psi aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde durch zweimaliges Zentrifugieren bei 38000 x g (10 min, 4° C) erhalten und sofort für die Enzymbestimmungen eingesetzt. Der Cytoplasma-Rohextrakt der Knöllchenzellen wurde gewonnen, indem der Überstand der Bakteroiden-Zentrifugation zunächst bei 4500 x g (15 min, 4° C), sodann 15 min bei 38000 x g und 4° C zentrifugiert wurde. Die Überprüfung der Reinheit des Cytoplasma-Rohextraktes zeigte, daß weniger als 1 % der Aktivität der bakteriellen Marker-Enzyme (3-HBDH und ADH) mit der pflanzlichen Fraktion verbunden war.

2.6.2. Herstellung zellfreier Extrakte von freilebenden Bakterien und pflanzlichem nichtinfiziertem Wurzelgewebe

Rhizobien aus Flüssigkeitskulturen (Nitrogenase-reprimierte und -dereprimierte Zellen) wurden 10 min bei 38000 x g und bei 4° C

zentrifugiert, zweimal im gleichen Volumen Wasser gewaschen, und das Sediment bei -80° C aufbewahrt. Zur Herstellung der zellfreien Extrakte wurden die freilebenden Bakterien in 0,05 M TES-Puffer mit 0,01 M red. Glutathion (pH 7,5) resuspendiert und wie unter 2.6.1. beschrieben aufgeschlossen.

Zur Herstellung der zellfreien Extrakte von nichtinfiziertem Wurzelgewebe (Kontrollpflanzen bzw. Pflanzen, von denen die Knöllchen abgesammelt wurden) wurden die Wurzeln (etwa 1 g Frischgewicht) kurz mit aqua bidest. gewaschen und anschließend in einem vorgekühlten Mörser mit Pistill in 5 ml 0,05 M TES-Puffer mit 0,01 M red. Glutathion (pH 7,5) unter Zugabe von PVP (1/3 des Frischgewichts) und einer Spatelspitze Seesand zerrieben; der Extrakt wurde anschließend über 250 µm - Gaze (Vereinigte Seidenwebereien AG, Krefeld) abgesaugt. Danach wurde zweimal 15 min bei 38000 x g und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die Enzymtests eingesetzt.

2.7. Aktivitätsbestimmungen der Enzyme

2.7.1. Aktivitätsbestimmung der Nitrogenase

Die Nitrogenase-Aktivität wurde mit Hilfe des Acetylen-Äthylen-Reduktions-Tests bestimmt. Dazu wurde ein Gaschromatograph (Varian, Modell 1440-10) benutzt, der mit einer Porapak R-Säule (182,88 cm x 0,32 cm) und einem Wasserstoff-Flammen-Detektor ausgerüstet war. Die Säule wurde bei 60° C, der Injektor bei 120° C und der Detektor bei 260° C betrieben. Die Retentionszeiten für Äthylen und Acetylen waren etwa 41 s und 47 s. Zu jeder Meßserie wurde ein aus den beiden Gasen bestehender Standard zur Eichung des Geräts injiziert. Diese Mischung enthielt 7,5 nmol Äthylen pro 0,5 ml, welches einer Peak - Höhe von 30 - 40 Einheiten entsprach (bei einer Meßempfindlichkeitseinstellung von 4×10^{-10} und einem vollständigen Skalenausschlag des Schreibers (Varian, Modell A-25) bei 2 mV). Bei einem konstanten Injektionsvolumen von 0,5 ml ist die Menge an injiziertem Äthylen

proportional der Peak-Höhe. Dieser Wert wurde benutzt, um das von der Nitrogenase gebildete Äthylen über die Peak-Höhe des Eichwertes, der während derselben Versuchsserie injiziert wurde, zu berechnen (WILCOCKSON and WERNER, 1976).

Von den Flüssigkeitskulturen (Rhizobium japonicum) wurden 5 Proben unter anaeroben Bedingungen entnommen und 90 bis 120 min in 21 ml - Flaschen unter einer Atmosphäre wie in 2.1. angegeben mit 10 % (w/v) C_2H_2 in der Gasphase bei 28° C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die Nitrogenase-Aktivität in diesen Proben war 2 h linear (WERNER and STRIPF, 1978).

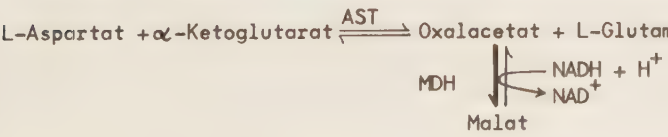
Die Nitrogenase-Aktivität in Knöllchen von Glycine max wurde durch einstündige Inkubation (im Dunkeln, 28° C) des ganzen Wurzelsystems einer Pflanze in 60 ml - Reagenzgläsern mit 8,3 % (v/v) Acetylen in Luft bestimmt. Nach einer lag-Phase von 5 min verläuft die Aktivität 1 h linear und ist in diesem System erst nach einigen Stunden leicht reduziert. Die mittlere Aktivität von 10 Pflanzen wurde verwendet.

Für einige Versuche zur Bestimmung der Knöllchenaktivität wurde der Sauerstoffanteil der Inkubationsatmosphäre von normalerweise 19 % (v/v) auf 40 % (+ 8,32 % Acetylen und 51,68 % N_2; v/v/v) erhöht.

2.7.2. Aktivitätsbestimmung der Aspartat-Aminotransferase, Alanin-Aminotransferase, Glutamat-Dehydrogenase, Alanin-Dehydrogenase, 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, Glutamat-Synthase und Glutamin-Synthetase

a) Aspartat-Aminotransferase (oder Glutamat-Oxalacetat-Transaminase) = AST (E.C. 2.6.1.1.):

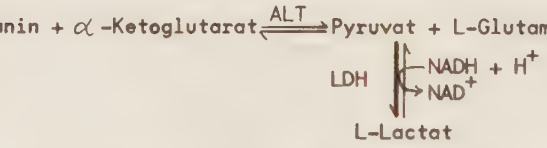
Die Aminotransferase AST wurde in einer gekoppelten Reaktion getestet:



Test verändert nach WERNER and GOGOLIN (1970): 2,4 ml HEPES-Puffer (Serva; 0,05 M, pH 7,8) mit 20 mg x ml^{-1} L-Asparaginsäure als neutrales Na-Asparaginat und 0,01 mg x ml^{-1} Pyridoxalphosphat; 0,05 ml Malat-Dehydrogenase (Boehringer; 0,5 mg x ml^{-1}, NH_4^+-frei); 0,05 ml NADH (Boehringer; 10 mg $NADH\text{-}Na_2$ x ml^{-1}); 0,05 ml zellfreier Extrakt. Nach 5 min Vorlauf: Start mit 0,05 ml α-Ketoglutarsäure (47 mg x ml^{-1}, pH 6,5 - 7,0).

b) Alanin-Aminotransferase (oder Glutamat-Pyruvat-Transaminase) = ALT (E.C. 2.6.1.2.):

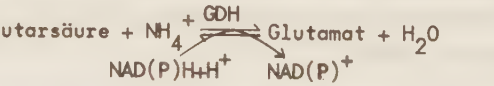
Die Aminotransferase ALT wurde in einer gekoppelten Reaktion getestet:



Test verändert nach BERGMEYER und BERNT (1962): 2,0 ml TRICIN-Puffer (Serva; 0,05 M, pH 8,3) mit 0,5 M L-Alanin; 0,05 ml Lactat-Dehydrogenase (Boehringer; 0,5 mg x ml^{-1}, NH_4^+-frei); 0,05 ml NADH (10 mg $NADH\text{-}Na_2$ x ml^{-1}); 0,05 ml zellfreier Extrakt. Nach 5 min Vorlauf: Start mit 0,05 ml α-Ketoglutarsäure (47 mg x ml^{-1}; pH 6,5-7,0).

c) Glutamat-Dehydrogenase = GDH (E.C. 1.4.1.2.):

Die GDH führt folgende reduktive Aminierung durch:



Test verändert nach DUNN and KLUCAS (1973): 1,0 ml TRIS-Puffer (Merck; 0,1 M, pH 8,4); 0,75 ml aqua bidest.; 0,05 ml α-Ketoglutarsäure (0,2 M, pH 6,5 - 7,0); 0,05 ml NADH (4 mM); 0,05 - 0,1 ml zellfreier Extrakt. Nach 4 min Vorlauf: Start mit 0,05 ml NH_4Cl (0,4 M).

d) Alanin-Dehydrogenase = ADH (E.C. 1.4.1.1.):

Die ADH führt ebenfalls eine reduktive Aminierung durch:

$$\text{Pyruvat} + NH_4^+ \underset{NADH+H^+}{\overset{ADH}{\rightleftharpoons}} \text{Alanin} + H_2O \quad NAD^+$$

Test verändert nach DUNN and KLUCAS (1973): 1,0 ml TRIS-Puffer (0,1 M, pH 8,6); 0,75 ml aqua bidest.; 0,05 ml Pyruvat als Mononatrium-Salz (0,2 M); 0,05 ml NADH (4 mM); 0,05 - 0,1 ml Extrakt. Nach 4 min Vorlauf: Start mit 0,05 ml NH_4Cl (0,4 M).

e) 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase = 3-HBDH (E.C. 1.1.1.30.):

Die 3-HBDH oxidiert 3-Hydroxybuttersäure zu Acetoacetat:

$$\text{3-Hydroxybuttersäure} + NAD^+ \overset{\text{3-HBDH}}{\rightleftharpoons} \text{Acetoacetat} + NADH+H^+$$

Test verändert nach WONG and EVANS (1971): 2,8 ml TRIS-Puffer (0,036 M, pH 8,0); 0,05 ml $MgCl_2 \times 6\ H_2O$ (0,06 M); 0,025 ml NAD (Boehringer; 48 mM); 0,05 - 0,1 ml zellfreier Extrakt. Nach 4 min Vorlauf: Start mit 0,025 ml DL-3-Hydroxybuttersäure als Natrium-Salz (0,8 M).

f) Glutamat-Synthase (oder Glutamine amide 2-oxoglutarate amino-transferase) = GOGAT (E.C. 1.4.1.13.):

Die Glutamat-Synthase überträgt in einer Transamidierung den Amid-N von Glutamin auf α-Ketoglutarsäure:

$$\text{Glutamin} + \alpha\text{-Ketoglutarsäure} \underset{NAD(P)H+H^+}{\overset{GOGAT}{\rightleftharpoons}} 2\ \text{Glutamat} \quad NAD(P)^+$$

Test verändert nach DUNN and KLUCAS (1973): 1,0 ml TES-Puffer (Serva; 0,1 M, pH 7,6); 0,78 ml aqua bidest.; 0,02 ml α-Ketoglutarsäure (0,1 M, pH 6,5 - 7,0); 0,05 ml NADH (4 mM); 0,05 - 0,1 ml zellfreier Extrakt. Nach 4 min Vorlauf: Start mit 0,05 ml L-Glutamin (0,2 M).

Bis auf die 3-HBDH wurde von allen bisher unter 2.7.2. genannten Enzymen das pH-Optimum sowohl in der bakteriellen, als auch in der pflanzlichen Fraktion bestimmt. Bei allen bakteriellen Enzymen wurde im pH-Optimum gemessen (Abb. 1), bei den pflanzlichen Enzymen ebenfalls (Abb. 2), bis auf die GPT, die bei 70 % und die Glutamat - Synthase, die bei 90 % ihrer maximalen Werte bestimmt wurden. Zur

Bestimmung der pH-Optima wurden vor allem Good-Puffer (GOOD et al., 1966) in den Konzentrationen wie für den jeweiligen Test angegeben, eingesetzt:
MES (pH 5,2 - 6,5), MOPS (pH 6,5 - 7,2), TES (pH 7,0 - 8,0), HEPES (pH 7,0 - 8,4), TRICIN (pH 8,2 - 9,1), TRIS (pH 8,4 - 8,8), Glycin (pH 9,1 - 10,5).

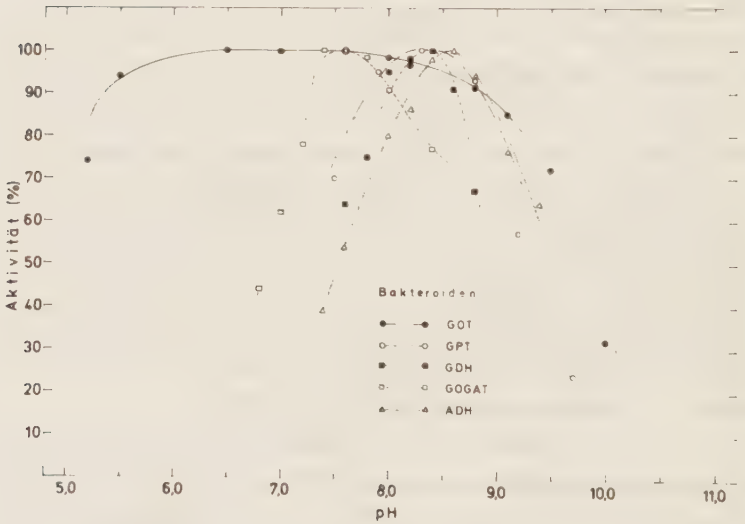


Abb. 1: pH-Optima von Enzymen aus Bakteroiden (Glycine max var. Caloria x R. japonicum 61-A-101; 35. Tag nach der Infektion). Die Aktivitäten jedes Enzyms wurden in % der maximalen Aktivität angegeben.

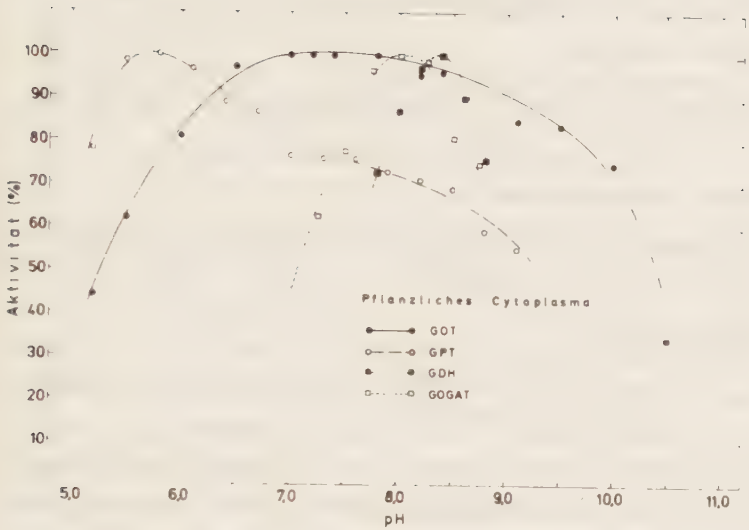


Abb. 2: pH-Optima von Enzymen aus pflanzlichem Cytoplasma (Glycine max var. Caloria x R. japonicum 61-A-101; 35. Tag nach der Infektion). Die Aktivitäten jedes Enzyms wurden in % der maximalen Aktivität angegeben.

In einem Spektralphotometer (Zeiss PM 4) wurde nach dem Start 5 min lang jede Minute die Extinktionsänderung bei 340 nm gemessen. Die Reaktionen wurden in Glas- oder Polystyrol-Einmal-Küvetten durchgeführt. Bei allen genannten Enzymen wurden die durch die NADH-Oxydation bedingte Extinktionsabnahme gemessen, bis auf die 3-HBDH, bei der die NADH-Zunahme gemessen wurde. Je Extrakt: Mittelwertbildung aus zwei Parallelen mit je fünf Werten unter Berücksichtigung eines Blindwertsatzes ohne Substrat. Die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden als spezifische Aktivitäten angegeben: 1 Unit = 1 µMol umgesetztes Substrat x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$ (bei 25° C).

g) Glutamin-Synthetase = GS (E.C. 6.3.1.2.):

Die GS kann folgende Reaktionen ausführen:

1. Biosynthese-Reaktion:

$$ATP + L\text{-Glutamat} + NH_4^+ \xrightleftharpoons[b)\ Mn^{2+}]{a)\ Mg^{2+}} L\text{-Glutamin} + ADP + P_i$$

2. Veränderte Biosynthese-Reaktion mit NH_2OH statt NH_3:

$$ATP + L\text{-Glutamat} + NH_2OH \xrightarrow[b)\ Mn^{2+}]{a)\ Mg^{2+}} \gamma\text{-Glutamylhydroxamat} + ADP + P_i$$

3. Transferase-Reaktion:

$$L\text{-Glutamin} + NH_2OH \xrightarrow[ADP,\ P_i \text{ oder Arsenat}]{a)\ Mn^{2+},\ b)\ Mg^{2+}} \gamma\text{-Glutamylhydroxamat} + NH_3$$

Die bakterielle Glutamin-Synthetase wurde verändert nach SHAPIRO and STADTMAN (1970) und BISHOP et al. (1976) getestet und im Allgemeinen als Transferase-Reaktion (s. Reaktion 3.) folgendermaßen durchgeführt:

15 ml 0,1 M Glutamin (pH 7,15); 2 ml Imidazol-HCl-Puffer (1,0 M, pH 7,15); 1 ml ADP-Na_2 (0,01 M, pH 7,15); 1,5 ml Na-Arsenat (1,0 M, pH 7,15); 1,5 ml Hydroxylamin-HCl (2,0 M, pH 7,0); 1,5 ml $MnCl_2 \times 4\ H_2O$ (0,01 M): aufgefüllt mit aqua bidest auf ein Volumen von 25 ml Testgemisch (pH 7,15).

Für den Enzymtest wurden 0,5 ml Testgemisch und 0,5 ml Extrakt (der zuvor mehrfach mit 0,05 M TES-Puffer (pH 7,15) verdünnt werden mußte) 10 min bei 25° C inkubiert (nachdem beide Teile zuvor 3 min vorinkubiert wurden) und dann durch Zugabe von 2 ml einer Lösung folgender Zusammensetzung gestoppt: 40 ml $FeCl_3$ (10 % w/w), 10 ml Trichloressigsäure (24 % w/w), 5 ml HCl (6 M), 65 ml aqua bidest. Nach der Farbentwicklung wurde 5 min bei 1300 x g abzentrifugiert (Christ, Labofuge II) und die Absorption bei 540 nm gegen den Blindwert ohne ADP und Arsenat im Testgemisch gemessen. Die Enzymmenge wurde so gewählt, daß unter diesen Testbedingungen die Reaktion

mindestens 15 min linear verlief.

Ein zweiter Mg^{2+}-abhängiger Test enthielt zusätzlich 60 mM $MgCl_2 \times 6\ H_2O$ im Reaktionsgemisch.

Die Eichkurve (Abb. 3 A) wurde mit γ-Glutamylhydroxamat (Sigma) erstellt. Die spezifische Aktivität wird in Units angegeben: 1 Unit = 1 µmol gebildetes γ-Glutamylhydroxamat x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$.

Außerdem wurde die bakterielle GS nach Reaktion 2. getestet (verändert nach PLANQUE et al. (1977). 0,9 ml Testgemisch enthielten 50 µmol Imidazol-HCl (pH 7,15); 20 µmol $MgCl_2 \times 6\ H_2O$; 25 µmol Mercaptoäthanol; 50 µmol Na-Glutamat; 100 µmol Hydroxylammoniumchlorid; 4,05 µmol Na_2-ATP; 56,25 µmol Creatinphosphat und 202,5 µg Creatinkinase (Boehringer). Für den Enzymtest wurden 0,9 ml Testgemisch und 0,1 ml Extrakt 15 min bei 25° C (in einigen Fällen auch bei 37° C) inkubiert (nachdem beide Teile zuvor 3 min bei der betreffenden Reaktionstemperatur vorinkubiert wurden) und durch Zugabe von 1,5 ml einer Lösung mit 0,37 M $FeCl_3$; 0,67 N HCl und 0,20 M Trichloressigsäure gestoppt. Nach der Farbentwicklung wurde 5 min bei 1300 x g abzentrifugiert (Christ, Labofuge II) und die Absorption bei 540 nm gegen den Blindwert ohne Na-Glutamat im Testgemisch gemessen. Die Enzymmenge wurde so gewählt, daß unter diesen Testbedingungen die Reaktion mindestens 20 min linear verlief.

Die Eichkurve (Abb. 3 B) wurde mit γ-Glutamylhydroxamat erstellt. Die spezifische Aktivität wird ebenfalls in Units angegeben (s. Transferase-Test).

Die Glutaminsynthetase-Aktivität des pflanzlichen Cytoplasmas wurde ebenfalls in der Regel durch den Transferase-Test bestimmt, jedoch nach MC PARLAND et al. (1976). Gegenüber dem Test der bakteriellen GS veränderte sich nur der Puffer: 1,25 M TES; als pH-Optimum wurde pH 6,5 bestimmt (Abb. 4). Ein weiterer Test enthielt statt Mn^{2+}-Ionen 5 mM $MgCl_2 \times 6\ H_2O$ im Reaktionsgemisch

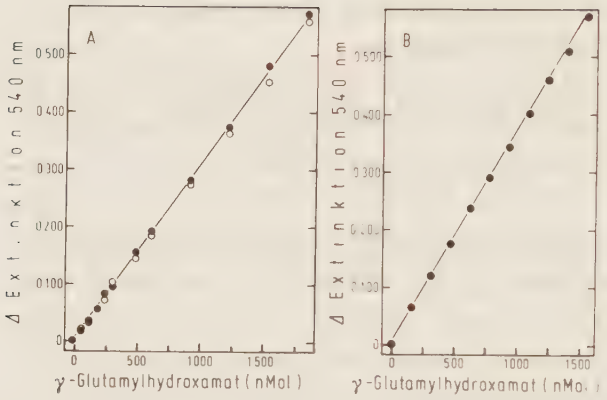


Abb. 3 A/B: Eichgeraden zu den GS-Test.

A) Transferase-Reaktion:

o——o Mn^{2+}- (bzw. Mn^{2+}+Mg^{2+}-) abhängiger Test (pH 7,15) der bakteriellen GS

●——● Mn^{2+}- (bzw. Mg^{2+}-) abhängiger Test (pH 6,5 bzw. 7,5) der GS aus pflanzlichem Cytoplasma

Weitere Bedingungen siehe Text.

B) Veränderte Biosynthese-Reaktion:

●——● Mg^{2+}-abhängiger Test (pH 7,15) der bakteriellen GS und Mg^{2+}-abhängiger Test (pH 6,5) der GS aus pflanzlichem Cytoplasma.

Weitere Bedingungen siehe Text.

(Optimum bei pH 7,5; ohne Abbildung). Die pH-Optima stimmen mit denen bei MC PARLAND et al. (1976) genannten überein.

Die pflanzliche GS wurde auch in der Biosynthese-Reaktion (s. Gleichung 2.) getestet. Hierbei unterscheidet sich dieser Test von dem der bakteriellen GS durch den Puffer: 50 µmol TES (pH 6,5)

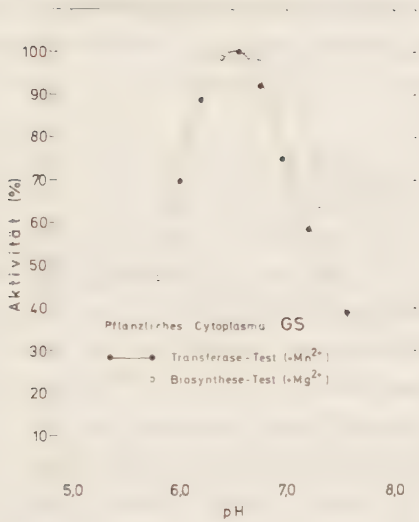


Abb. 4: pH-Optima der GS aus pflanzlichem Cytoplasma (Glycine max var. Caloria x Rhizobium japonicum 61-A-101; 23. Tag nach der Infektion).
●——————● Transferase-Test (+ Mn^{2+})
O----------O Biosynthese-Test (+ Mg^{2+})
Die Aktivitäten wurden in % der maximalen Aktivität angegeben.

und der Inkubationsdauer: 10 min bei 25° C. Das pH-Optimum lag bei pH 6,5 (Abb. 4). Die Eichkurve mit γ-Glutamylhydroxamat ist identisch mit dem Biosynthese-Test der bakteriellen GS (Abb. 3 B).

Für alle GS-Tests gilt, daß ein Meßpunkt der Mittelwert aus drei Parallelbestimmungen darstellt.

Für die unter 2.7.2. genannten Enzyme wurden noch nicht die von der "International Organization for Standardization" empfohlenen katalytischen Aktivitäten in "Katal" angegeben, weil bisher ausnahmslos alle Arbeiten über dieses Sachgebiet "Units" (= 1 µmol x

min^{-1}) verwenden. Vergleiche mit diesen Veröffentlichungen sind somit wesentlich einfacher. Die Einheit der katalytischen Aktivität heißt kat und entspricht 1 mol x s^{-1}; zur Umrechnung: 1 Unit = 16,67 nkat.

2.8. Bestimmung des Leghämoglobingehalts

Die Leghämoglobin (Lb)-Konzentration wurde mit dem Pyridin-Hämochrom-Test (APPLEBY, 1969) in den Cytoplasmaextrakten bestimmt. Gleiche Volumina Cytoplasma-Extrakt und alkalisches Pyridin-Reagenz (0,2 M NaOH; 4,2 M Pyridin) wurden gemischt und mit etwas $Na_2S_2O_4$ reduziert (3 Parallelbestimmungen). Der rote Farbstoff wurde bei 556 nm gegen einen Reagenzblindwert gemessen. Das reduzierte Hämochrom wurde wegen geringer Stabilität (DE DUVE, 1948) innerhalb von 5 min bestimmt. Als Extinktionskoeffizient wurde ε_{mM}(556 nm) = 34,6 verwendet (APPLEBY, 1969; PAUL et al., 1953). Die Leghämoglobin-Konzentration wurde in relativen Einheiten, bezogen auf g Knöllchen-Frischgewicht, angegeben, wobei eine relative Einheit 1 x 10^{-2} µmol entspricht.

2.9. Spektroskopie von pflanzlichen Cytoplasma einschließlich Vesikelinhalt

Die Absorptionsspektren wurden bei Zimmertemperatur in einem Zeiss DMR 10-Spektralphotometer unter Verwendung von OS-Küvetten von 1 cm Schichtdicke aufgenommen. Als Referenz diente 0,5 M TES-Puffer pH 7,5.

2.10. Proteinbestimmungen

Methode nach BRADFORD (1976):

Reagenzlösung: 100 mg (65 % Farbstoff: BRADFORD (1976); bei einem 98 % Farbstoffgehalt ist die Verwendung von 65 mg angebracht)

Coomassie Brillant Blau G-250 in 50 ml absolutem Äthanol (mindestens 1 h) lösen, danach 100 ml 85 % Orthophosphorsäure zugeben und auf 1 l mit aqua bidest. auffüllen. Die so hergestellte Reagenzlösung wurde zwei Wochen bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt.

Proteinstandard: 1 mg Rinderserumalbumin (Boehringer) x ml^{-1} aqua bidest. Verschiedene zeitlich unabhängig voneinander angesetzte Proteinstandardlösungen führten zu einer Eichgeraden (Abb. 5 A); Leerwert: $\Delta E_{578\ nm}$ 0.44 - 0.45 (unterschiedlich bei verschiedenen Farbstoff-Konzentrationen).

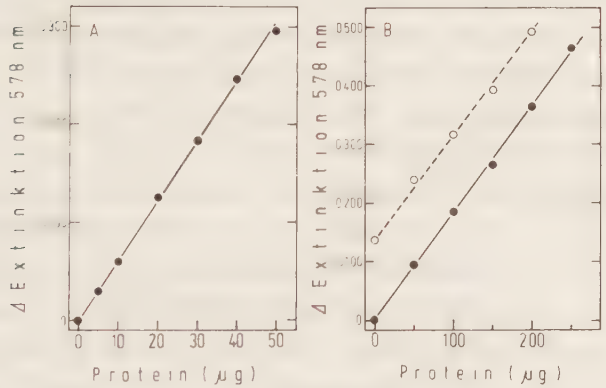


Abb. 5 A/B: Eichgeraden zu den Proteinbestimmungen.

A) Methode nach BRADFORD (1976):
Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug 5,1 ml.
Weitere Bedingungen siehe Text.

B) Methode verändert nach LOWRY et al. (1951):
Das Testvolumen betrug 6,0 ml.
●——● Eichgerade ohne red. Glutathion
○--------○ Eichgerade mit red. Glutathion
Weitere Bedingungen siehe Text.

Vorgehen: 1. Bis zu 50 µl Probe oder Standard mit aqua bidest. auf 100 µl auffüllen (4 Parallelbestimmungen).
2. 5 ml Reagenzlösung hinzufügen und auf einem Whirl-Mixer einige Sekunden kräftig schütteln (Reagenzlösung vor der Zugabe einige Male leicht schwenken).
3. Nach dem Durchmischen den Testansatz sofort vorsichtig (zur Vermeidung von Luftperlen) in eine 3 ml Einwegküvette (!) geben.
4. Nach 2 min Inkubation bei 578 nm gegen den Reagenzleerwert messen.

Nach WERNER veränderte Lowry-Methode (LOWRY et al., 1951):

Reagenzlösung: Am Tag der Bestimmung Lösung C, bestehend aus folgenden Komponenten herstellen: 2 ml 2 % $CuSO_4 \times 5 H_2O$; 2 ml 4 % Na-K-Tartrat und 100 ml 3 % Na_2CO_3. Weitere zu benötigende Lösungen: Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz und 5 N NaOH.

Proteinstandard: 1 mg Rinderserumalbumin (Boehringer) x ml^{-1} aqua bidest. Eichgerade: s. Abb. 5 B.

Vorgehen: 1. Zum proteinhaltigen Extrakt (z.B. 50 µl) oder zum Standard werden 0,1 ml 5 N NaOH hinzugefügt; anschließend auf Gesamtvolumen 0,5 ml mit aqua bidest. auffüllen (3 Parallelbestimmungen).
2. 5 ml Lösung C hinzufügen, auf einem Whirl-Mixer einige Sekunden kräftig schütteln und 10 min bei Zimmertemperatur stehen lassen.
3. Dann 0,5 ml Folin-Reagenz hinzufügen und sofort intensiv mit einem Whirl-Mixer schütteln.
4. Nach 30 min Wartezeit bei Zimmertemperatur (im Dunkeln) bei 578 nm gegen den Reagenzleerwert messen.

Die von HERBERT et al. (1971) angegebene modifizierte Lowry-Methode mit u.a. einer geringeren NaOH-Konzentration und 1 N Folin-Reagenz ergibt dieselben Proteinwerte wie die oben ange-

gebene Lowry-Methode, zeigt aber eine wesentlich geringere Veränderung der entwickelten Farbintensität nach 30 min Reaktionsdauer auf.

Das im Rohextrakt vorhandene red. Glutathion (0,01 M) stört im Gegensatz zur Bradford-Methode die Lowry-Methode beträchtlich (VALLEJO and LAGUNAS, 1970; GEIGER and BESSMAN, 1972; HIGUCHI and YOSHIDA, 1977). Enthielten die Meßpunkte der Eichgeraden jeweils 0,01 M red. Glutathion in 50 µl (50 µl Probenvolumen war für die Proteinbestimmung üblich) zusätzlich, so entstand eine parallelverschobene Eichgerade (Abb. 5 B: gestrichelt). Dadurch konnten die Proteinwerte durch einen mitgemessenen Blindwert mit Glutathion errechnet werden.

Methode nach POTTY (1969):

Reagenzlösungen: Lösung A: 2 % Na_2C0_3 in 0,1 N NaOH; Lösung B: 1 ml einer Lösung mit 0,5 % $CuSO_4$ in 1 % Na-K-Tartrat mit 50 ml Lösung A mischen (am Tag der Bestimmung). Weiterhin wurde Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz mit 1 N Azidität benötigt. (Dazu wurden zu 10 ml Folin-Reagenz (Merck) 10 ml aqua bidest. am Tag der Bestimmung hinzugefügt.)

Proteinstandard: 1 mg Rinderserumalbumin (Boehringer) x ml^{-1} aqua bidest. Eichgeraden mit und ohne Cu^{2+}: s. Abb. 5 C.

Vorgehen:
1. 1 ml Aliquots mit 100 - 400 µg Protein getrennt mit 5 ml Lösung A und B auf einem Whirl-Mixer schütteln.
2. Nach 10 min (bei Zimmertemperatur) jeweils 1 ml des 1 N Folin-Reagenz hinzufügen und sofort schütteln.
3. Nach 30 min bei Raumtemperatur (im Dunkeln) bei 500 nm gegen die Reagenzleerwerte messen. Die Differenz ($\Delta E + Cu^{2+}$ minus $\Delta E - Cu^{2+}$) zwischen den zwei Ablesungen wurde zur Berechnung des Proteingehalts benutzt.

Die Proteinbestimmungsmethode nach Potty ist für die Bestimmung von Extrakten mit phenolischen Verbindungen von Bedeutung. Sie beruht darauf, daß durch Subtraktion des Wertes ohne Cu^{2+}, der ein Maß für die phenolischen Gruppen darstellt (WU, 1922) vom Wert mit Cu^{2+}, der die phenolischen Verbindungen und Proteine erfaßt, der reine Proteingehalt errechnet werden kann.

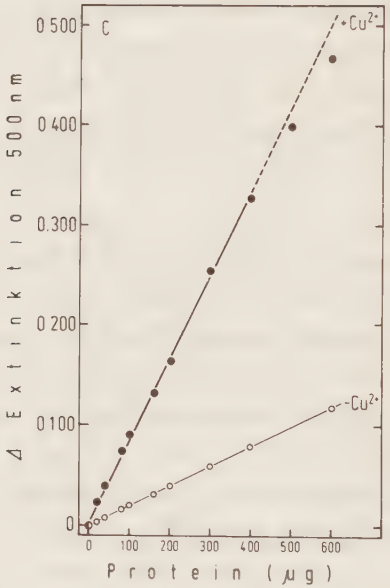


Abb. 5 C: Eichgeraden zur Proteinbestimmung nach POTTY (1969). Das Testvolumen betrug 7,0 ml. Weitere Bedingungen siehe Text.

Fast alle Routinemessungen wurden in leichter Abänderung nach der Methode von BRADFORD (1976) durchgeführt. Teilweise wurden die Ergebnisse mit denen der modifizierten Lowry-Methode (LOWRY et al., 1951) und denen nach der Methode von Potty (1969) verglichen, da in zwei neueren Arbeiten (PIERCE and SUELTER, 1977; VAN KLEY and HALE, 1977) Kritik an der Methode von Bradford ge-

übt wurde.

Bei der Methode nach Bradford reagiert der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie Brillant Blau G-250 in seiner orangefarbenen Leukoform über seine SO_3^--Gruppen mit den Aminogruppen eines Proteins (Abb. 6). Der gebildete intensiv blaue Farb-Protein-Komplex wird durch Van der Waalsche Kräfte stabilisiert (FAZEKAS DE ST. GROTH et al., 1963). Der Test kann für Proteine und Polypeptide mit einem Molekulargewicht größer als 3000 benutzt werden (SEDMAK and GROSSBERG, 1977), er ist gut reproduzierbar und sehr empfindlich.

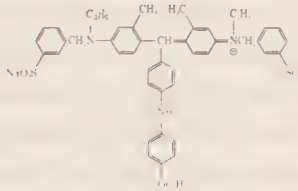


Abb. 6: Strukturformel des Farbstoffes Coomassie Brillant Blau G-250.
Der Farbstoff Coomassie Brillant Blau R-250 (FAZEKAS DE ST. GROTH et al., 1963) besitzt 2 Methylgruppen weniger.

Neuerdings wurde gefunden, daß innerhalb eines Proteinkonzentrationsbereichs von 0,8 bis 10 $\mu g \times ml^{-1}$ der Extinktionskoeffizient des Farb-Protein-Komplex sich nicht veränderte, wenn das Volumen des Farbreagenz von 0,5 bis 5 ml variierte. Dieser Sachverhalt erlaubt eine Erhöhung der Empfindlichkeit des Tests in umgekehrter Abhängigkeit vom Volumen des hinzugefügten Farbreagenz (SPECTOR, 1978).

Die Methode wurde daraufhin untersucht, ob bestimmte Substanzen Störungen ergeben. Die untersuchten Substanzen TES, oxid. und

red. Glutathion zeigten keine Beeinflussung. Viele weitere Substanzen, die üblicherweise Störungen bei der Lowry-Methode verursachen, weisen keine bei der Bradford-Methode auf (SPECTOR, 1978; SEDMAK and GROSSBERG, 1977; Bio Rad Laboratories, Technical Bulletin 1051 E, 1977).

Für die Bestimmung des Proteingehalts von pflanzlichen Cytoplasmaextrakten wird die Bradford-Methode besonders wichtig, da die Lowry-Methode durch Häm (BOCTOR, 1972) und phenolische Verbindungen (SOLECKA et al., 1968; KHANNA et al., 1969; LOWRY et al., 1951) gestört wird. Phenolische Verbindungen wie Flavone, Isoflavone, Flavonole, Flavonone, Chalcone, Cumarine und Stilbene sind bei den Leguminosen weit verbreitet (HARBORNE and SIMMONDS, 1964). Durch die Zugabe von unlöslichem PVP bei der Extraktion werden die phenolischen Verbindungen nur unvollständig entfernt (HAISSIG and SCHIPPER, 1975). Möglicherweise bindet PVP nur Phenole mit einem Molekulargewicht größer als das der Chlorogensäure: MG 354 (ANDERSON, 1968), was problematisch ist, da die meisten phenolischen Verbindungen kleine Moleküle darstellen.

POLLARD et al. (1978) fanden in Extrakten der Nebennierenrinde vom Rind einen hohen Anteil von phenolischen Catecholaminen, welche die Lowry-Methode beträchtlich, die Bradford-Methode hingegen nicht störten. Dieselbe Aussage kann über die hier untersuchte Chlorogensäure gemacht werden. Daß mit der Bradford-Methode phenolische Verbindungen nicht erfaßt werden, ist theoretisch aufgrund der Reaktionsweise (s.o.) zu erwarten, da einerseits die meisten phenolischen Verbindungen keine Aminogruppen enthalten und andererseits niedermolekulare Verbindungen darstellen.

Der für das untersuchte Objekt geeignete Proteinstandard ist bei Verwendung der Bradford-Methode wichtig, und die Proteinwerte sollten mit anderen Protein-Bestimmungsmethoden verglichen werden. So ergeben die Nebennierenrinden-Extrakte von POLLARD et al. (1978) mit dem von Bio-Rad im Technical Bulletin 1051 E (1977) allgemein

empfohlenen Rindergammaglobulin-Standard doppelt so hohe Proteinwerte wie mit Rinderserumalbumin.

In Tabelle 1 werden die nach Bradford, Lowry und Potty ermittelten Proteinwerte pflanzlicher Cytoplasmaextrakte von 28 und 58 Tage alten Knöllchen (G. max var. Caloria x R. japonicum 61-A-101) miteinander verglichen. Es zeigt sich, daß die Bradford- und Potty-Methode fast gleiche Werte liefern, während nach der Lowry-Methode bei 28 Tage alten Knöllchen (s. 1a) 22 % und bei 58 Tage alten Knöllchen 87 % (s. 2a) mehr Protein bestimmt wird (bei einem Aufschluß ohne red. Glutathion). Die Aufschlüsse mit red. Glutathion zeigen, daß durch Blindwerte mit red. Glutathion bei der Proteinbestimmung nach Lowry die Störung ausgeschaltet werden kann (s. 1b, 2b). Um festzustellen, welche Verbindungen die erhöhten Werte bei Lowry verursachen, wurden die Rohextrakte auf einer Sephadex G 25 (Fine)-Säule (0,05 M TES-Puffer pH 7,5; Säulenfüllung: 1 x 10 cm) aufgetrennt. Die Überprüfung der niedermolekularen Fraktion (die nicht quantitativ aufgefangen wurde, um eine zu starke Verdünnung zu vermeiden) ergab im Gegensatz zur Bradford-Methode eine positive Reaktion bei der Lowry-Methode (s. 1a, 2a). In der hochmolekularen Fraktion konnten mit allen Bestimmungsmethoden etwa gleiche Werte ermittelt werden (s. 1a, 2a). Dies bedeutet auch, daß der Proteinstandard Rinderserumalbumin richtig gewählt ist.

Da nach der Bradford-Methode Moleküle unter einem MG von 3000 (s. oben) nicht erfaßt werden, kann in der niedermolekularen Fraktion auch keine Reaktion erfolgen, die auf Peptiden beruht, falls diese die Ursache der Störung sein sollten. Da aber andererseits durch die Potty-Methode gleiche Werte wie nach der Bradford-Methode gewonnen werden, ist es wahrscheinlich, daß sich in der niedermolekularen Fraktion vor allem phenolische Verbindungen störend auswirken.

Der Proteingehalt der Bakterien- und Bakteroiden-Extrakte wurde ebenfalls nach der Bradford-Methode bestimmt; diese Werte unterschieden sich maximal um ± 10 % von jenen Werten, gewonnen nach der Lowry-Methode.

Tab. 1: Vergleich der nach der Bradford-, Lowry- und Potty-Methode gewonnenen Proteinwerte pflanzlicher Cytoplasmaextrakte von 28 und 58 Tage alten Knöllchen (G. max var. Caloria x R. japonicum 61-A-101). Weitere Einzelheiten s. Text.

Fraktion	Bradford	Lowry	Potty
1) 28 Tage alte Knöllchen:			
a) Aufschluß ohne red. Glutathion:			
Rohextrakt	3,38 mg x ml^{-1}	4,13 mg x ml^{-1}	3,43 mg x ml^{-1}
	15,83 mg x g Frisch-gewicht^{-1} (100%)	19,33 mg x g Frisch-gewicht^{-1} (122%)	16,06 mg x g Frisch-gewicht^{-1} (101%)
Hochmolekulare Fraktion (Saulen-Aufgabe: 1 ml Rohextrakt)	3,31 mg	3,28 mg	3,28 mg
Niedermolekulare Fraktion (Saulen-Aufgabe: 1 ml Rohextrakt)	0 mg	0,37 mg	-
b) Aufschluß mit red. Glutathion:			
Rohextrakt	3,33 mg x ml^{-1}	4,26 mg x ml^{-1}	-
	15,59 mg x g^{-1} (100%)	19,95 mg x g^{-1} (128%)	-
2) 58 Tage alte Knöllchen:			
a) Aufschluß ohne red. Glutathion:			
Rohextrakt	2,22 mg x ml^{-1}	4,16 mg x ml^{-1}	2,16 mg x ml^{-1}
	8,39 mg x g^{-1} (100%)	15,72 mg x g^{-1} (187%)	8,16 mg x g^{-1} (97%)
Hochmolekulare Fraktion (Saulen-Aufgabe: 1 ml Rohextrakt)	2,04 mg	2,21 mg	2,18 mg
Niedermolekulare Fraktion (Saulen-Aufgabe: 1 ml Rohextrakt)	0 mg	1,06 mg	-
b) Aufschluß mit red. Glutathion:			
Rohextrakt	2,21 mg x ml^{-1}	4,47 mg x ml^{-1}	-
	8,46 mg x g^{-1} (100%)	17,09 mg x g^{-1} (202%)	-

2.11. Bestimmung des Frisch- und Trockengewichts

Zur Bestimmung des Frischgewichts wurden die Knöllchen und Wurzeln, sofern notwendig, mit Zellstoff abgetupft und sofort gewogen.

Zur Bestimmung des Trockengewichts wurde das Material 72 h gefriergetrocknet (Edwards EF II), 3 h bei 105° C nachgetrocknet (zur Entfernung von noch vorhandenen flüchtigen Substanzen, die etwa 0,85 % des Frischgewichts ausmachen), 45 min im Exciccator abgekühlt und bis zur Gewichtskonstanz gewogen.

2.12. Bestimmung des C-, H- und N-Gehalts

Die CHN-Analysen wurden im Analytik-Service-Labor des Fachbereiches Chemie mit einem Heraeus-CHN-Mikro (Fa. N.C. Heraeus) nach dem von MONAR (1972) entwickelten Verfahren durchgeführt. Dazu wurden 2 - 4 mg des pulverisierten Materials eingewogen und die 3 Komponenten C, H und N nacheinander durch Wärmeleitfähigkeitsmessung bestimmt. Der dabei auftretende maximale Fehler im Gerät liegt bei $\pm$ 0,2 % für alle 3 Elemente.

2.13. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Um die morphologische Entwicklung der Nitrogenase-aktiven und -inaktiven Wurzelknöllchen nachzuvollziehen, wurden diese von Pflanzen (Glycine max var. Caloria infiziert mit R. japonicum 3I1b85 bzw. 61-A-24; s. 2.3.) 11, 15, 20 (bzw. 21), 25, 29 und 35 Tage nach der Infektion abgesammelt. Nur Knöllchen einer mittleren Größe, die typisch für das jeweilige Entwicklungsstadium waren, wurden ausgesucht und im frischen Zustand zur Herstellung elektronenmikroskopischer Aufnahmen mit einem Philips EM 301 (WERNER and MÖRSCHEL, 1978) weiterverarbeitet. Die Negative wurden freundlicherweise von Herrn E. Mörschel (Botanisches Institut, Marburg) zur Verfügung gestellt. Die Abbildungen II, IV, V, VI und VII wurden bereits in WERNER and MÖRSCHEL (1978) veröffentlicht.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakterisierung der Soja-Sorten (Mandarin, Caloria, Chippewa 64)

Die Sorte Mandarin läßt sich auf die "Ahnen"-Sorte Mandarin, Chippewa 64 auf die Sorten Manchu, Mandarin und Richland, welche alle in der Mandschurei beheimatet sind, zurückführen (JOHNSON and BERNARD, 1963). Caloria wurde in Gießen am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Justus Liebig-Universität gezüchtet und geht auf nicht mehr genau zu bestimmendes altes deutsches, aber ursprünglich asiatisches Material zurück (POSSELT, persönliche Mitteilung). Das Saat-Gewicht von Caloria und Chippewa 64 ist relativ ähnlich, während jenes von Mandarin wesentlich höher liegt:

Mandarin: 20,79 g x 100 Samen^{-1} (100 %)
Caloria: 14,12 g x 100 Samen^{-1} (68 %)
Chippewa 64: 12,40 g x 100 Samen^{-1} (62 %)

Weiterhin bilden die Sorten Caloria und Chippewa 64 Ranken; die Sorte Mandarin hingegen läßt dieses Merkmal vermissen und besitzt außerdem größere Blätter. Weitere physiologische Unterschiede: s. auch unter 3.5.1.

3.2. Wachstum effektiver und ineffektiver Knöllchen

3.2.1. Knöllchenzahl und -gewicht

Die Knöllchen der Soja-Pflanzen werden etwa 10 bis 12 Tage nach der Infektion mit Rhizobien an den Wurzeln sichtbar. Das Mittlere Frischgewicht eines effektiven Knöllchens (Abb. 7), errechnet aus einer Stichprobengröße von 30 Pflanzen der Sorten Caloria und Mandarin (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101), nimmt bis etwa zum 24. Tag rasch zu (vom 15. Tag an um etwa das 3,5 - 4-fache) und steigt innerhalb der folgenden zwei Wochen etwas langsamer an. Etwa vom 45. Tag an

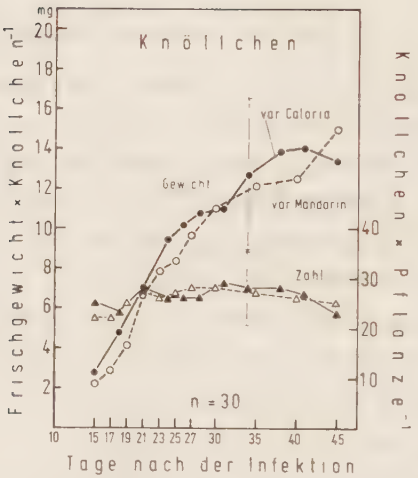


Abb. 7: Entwicklung der Knöllchenzahl pro Pflanze und des Frischgewichts pro Knöllchen von Glycine max var. Caloria und var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 30 Pflanzen.

beginnt dann die Absterbephase. Die hohe Standardabweichung ist darauf zurückzuführen, daß bei jedem Erntezeitpunkt - trotz relativ gleichbleibender Knöllchenzahl pro Pflanze - verschieden große Knöllchen gefunden werden. Allerdings verschiebt sich das Zahlenverhältnis von kleinen zu großen Knöllchen mit steigendem Alter der Pflanze in Richtung der größeren (s. 3.1.2.). Die mittlere Knöllchenzahl pro Pflanze schwankt zwischen 22 und 29 während der gesamten Entwicklungszeit für die genannten Sorten (Abb. 7); sie bleibt also relativ konstant. Bemerkenswert ist, daß schon vom 15. Tag an keine wesentliche Steigerung der Zahl erreicht wird.

Bei der Sorte Chippewa 64 (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101) und nach Infektion aller drei genannten Sorten mit einem

anderen effektiven Rhizobienstamm (3I1b85) erhält man einen ähnlichen Verlauf der Kurven, so daß hier weder eine Sortenabhängigkeit noch eine unterschiedliche Reaktion auf verschiedene Rhizobienstämme nachweisbar sind.

Die mit dem ineffektiven Stamm von Rhizobium japonicum (61-A-24) infizierten Sorten Caloria und Mandarin reagieren jedoch sehr unterschiedlich. Die Knöllchenzahl vermehrt sich bei Mandarin vom 15. bis zum 50. Tag um das Vierfache (bis zu 80 Knöllchen pro Pflanze), während bei Caloria innerhalb desselben Zeitraums eine Vermehrung um das Fünffache (über 140 Knöllchen pro Pflanze) erfolgt (Abb. 8). Dieser starke sortenabhängige Effekt bezüglich der Zahl findet sich in umgekehrter Weise, aber schwächer ausgeprägt bezüglich des mittleren Knöllchengewichts wieder: alle Meßpunkte der Sorte Mandarin liegen höher als die der Sorte Caloria. Außerdem ist im Gegensatz zu den effektiven Knöllchen (bis zu15 mg pro Knöllchen) kaum eine Gewichtszunahme zu beobachten: das mittlere Frischgewicht pro Knöllchen steigt nicht über 4 mg. Diese niedrigen Werte bei den ineffektiven Knöllchen erklären sich nicht nur aus der stetigen Neubildung von Knöllchen, sondern auch dadurch, daß die Knöllchen insgesamt kleiner bleiben (s. 3.1.2.). Die sortenspezifischen Unterschiede der ineffektiven Knöllchen kompensieren sich jedoch, wenn man die Gesamtmasse der Knöllchen (bezogen auf 10 Pflanzen) miteinander vergleicht (Abb. 9). Das Gesamtgewicht der effektiven Knöllchen (Rhizobium japonicum 61-A-101) pro 10 Pflanzen der Sorte Caloria liegt jedoch etwas höher als das der ineffektiven während der Entwicklung.

Die Zahl der an einem Tag abgesammelten Knöllchen kann stark streuen. Bildet man das Verhältnis von Knöllchenzahl und Knöllchengewicht pro Pflanze (Abb. 10) an einem Erntetag (Glycine max var. Caloria x Rhizobium japonicum 61-A-24; 27. Tag nach der Infektion; Stichprobengröße 29 Pflanzen), so liegen die Punkte im Idealfall auf einer Hyperbel. Dies bedeutet, daß innerhalb der Sorte eine Kompensation in bezug auf die Knöllchenproduktion (Gewicht pro Pflanze) stattfindet, und ein

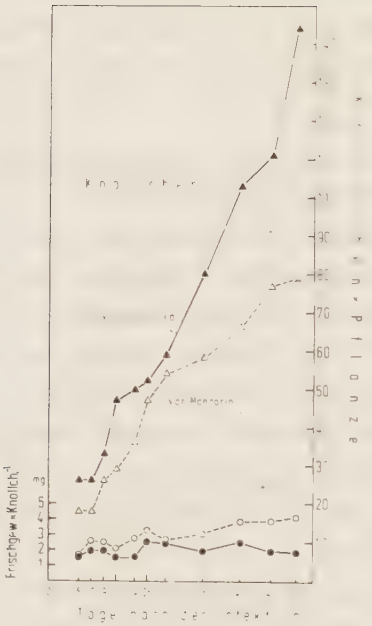


Abb. 8: Entwicklung der Knöllchenzahl pro Pflanze und des Frischgewichts pro Knöllchen von Glycine max var. Caloria und var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 10 Pflanzen.

bestimmter Sättigungswert nicht überschritten wird. Für die effektiven Rhizobienstämme konnte bei gleicher Stichprobengröße diese Abhängigkeit nicht nachgewiesen werden.

Neben den Größenunterschieden zwischen effektiven und ineffektiven Knöllchen konnten makroskopisch auch farbliche Unterschiede festgestellt werden: nach dem Aufschneiden waren effektive Knöllchen rot gefärbt, mit grünen Zonen in älteren Stadien (Leghämoglobin und Abbauprodukte), ineffektive hingegen erschienen immer weiß bis grünlich. Außen waren effektive Knöllchen braun bis rot gefärbt, während sich ineffektive Knöllchen meist als weißlich bis hellgrün

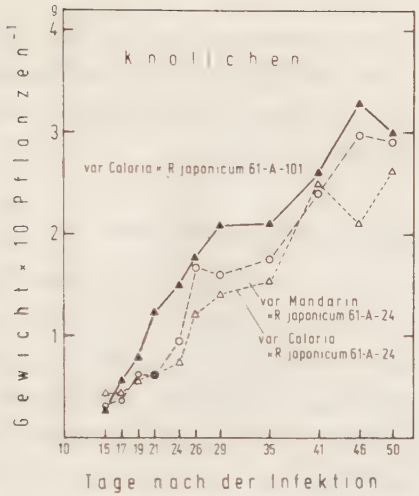


Abb. 9: Entwicklung des Knöllchengewichts pro 10 Pflanzen von Glycine max var. Caloria und var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24 und von Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101.

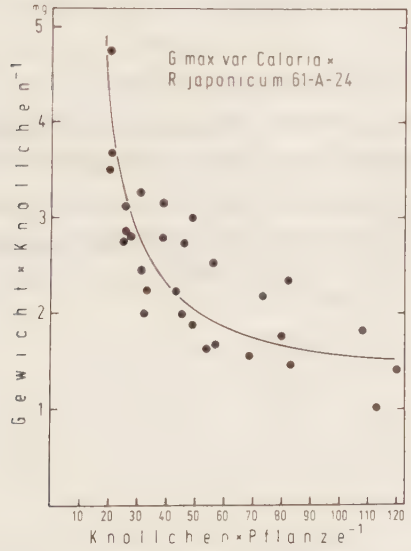


Abb. 10: Verhältnis zwischen Knöllchengewicht und Knöllchenzahl x Pflanze^{-1} bei Glycine max var. Caloria (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24) am 27. Tag nach der Infektion.

erwiesen. Der Habitus der Pflanzen mit ineffektiven Knöllchen ähnelte der Entwicklung der nicht infizierten, stark chlorotischen und wachstums gehemmten Kontrollpflanzen, während Pflanzen mit effektiven Knöllchen grüne, kaum chlorotische Blätter hatten.

3.2.2. Fraktionierung der Knöllchen nach Größe

Um die Größenverteilung der Knöllchen eines Erntetages zu ermitteln, wurden diese durch fraktionierte Siebung in Größenklassen unterteilt. Dies war möglich, da sowohl die effektiven als auch die ineffektiven Knöllchen der Sojabohne relativ rund gestaltet sind, was bei den Leguminosen durchaus nicht üblich ist (CORBY, 1971). Das jeder Größenklasse zugeordnete mittlere Knöllchenfrischgewicht wird in Tab. 2 wiedergegeben. Die hohe Standardabweichung der kleinsten Klasse (< 1600 µm) erklärt sich daraus, daß diese Klasse nach unten unbegrenzt ist, während die größte Klasse (> 4000 µm) kaum noch überschritten wird. Es konnten keine signifikanten Gewichtsunterschiede pro Klasse zwischen effektiven und ineffektiven Knöllchen nachgewiesen werden.

Tab. 2: Mittleres Gewicht eines Knöllchens pro Siebstufe (Glycine max var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101). Pro Siebstufen-Maschenweite (µm) wird neben dem mittleren Knöllchen-Frischgewicht auch die Standardabweichung (mg) auf der Grundlage entsprechender Stichprobengrößen angegeben.

Mittleres Gewicht eines Knöllchens pro Siebstufe

(Material: G. max var. Mandarin x R. japonicum 61-A-101)

Größe (µm)	Gewicht (mg)	Stichprobengröße (Erntestadien)
< 1600	1,60 ∓ 0,54	12
> 1600	2,61 ∓ 0,28	6
> 1800	3,17 ∓ 0,28	6
> 2000	4,52 ∓ 0,25	6
> 2200	5,70 ∓ 0,42	6
> 2400	7,11 ∓ 0,59	6
> 2600	9,08 ∓ 0,59	6
> 2800	12,33 ∓ 0,96	6
> 3000	15,09 ∓ 0,99	6
> 3300	19,75 ∓ 1,12	6
> 3600	26,06 ∓ 3,12	6
> 3800	30,18 ∓ 2,13	6
> 4000	39,67 ∓ 3,38	6

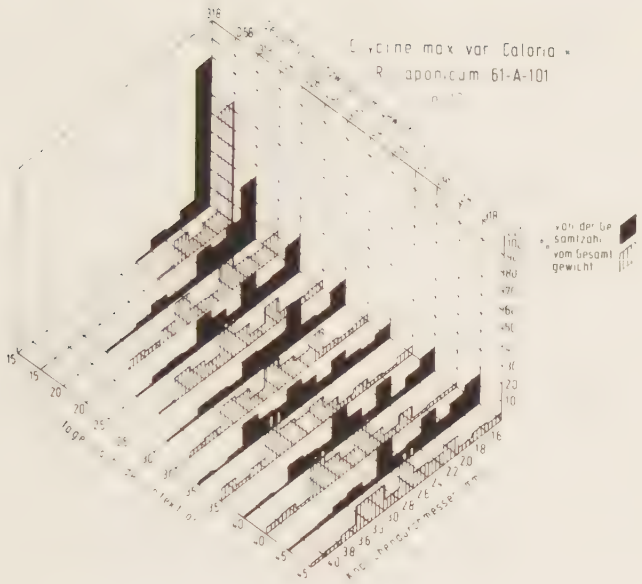


Abb. 11: Räumliche Darstellung der Größenverteilung der Knöllchen von Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101 in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen. Pro Versuchstag wird für jede Siebstufe der prozentuale Anteil der Knöllchen an der Gesamtzahl und am Gesamtgewicht angegeben. Die absoluten Werte von Gesamtzahl und Gesamtgewicht befinden sich über den Säulendiagrammen. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 10 Pflanzen.

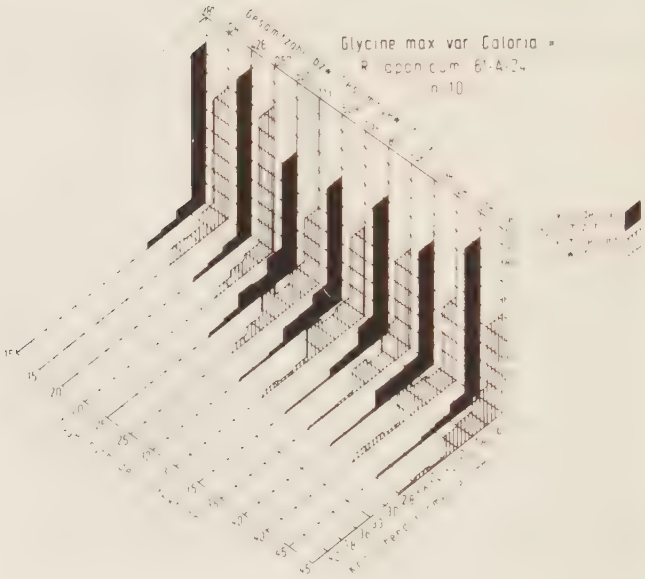


Abb. 12: Räumliche Darstellung der Größenverteilung der Knöllchen von Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24 in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen. Pro Versuchstag wird für jede Siebstufe der prozentuale Anteil der Knöllchen an der Gesamtzahl und am Gesamtgewicht angegeben. Die absoluten Werte von Gesamtzahl und Gesamtgewicht befinden sich über den Säulendiagrammen. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 10 Pflanzen.

Die Entwicklung der Größenverteilung verläuft bei den effektiven Knöllchen derart, daß der prozentuale Gewichts- und Zahlen-Anteil der kleinsten Fraktion vom 15. Tag an innerhalb von 10 Tagen rapide abnimmt. In Abb. 11 ist dieser Verlauf für Glycine max var. Caloria (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101) räumlich abgebildet. Um den 20. Tag, an dem etwa das Maximum der Nitrogenase-Aktivität liegt (s. 3.4.), sind alle Knöllchen noch unter 3600 µm groß, während am 35. Tag schon einige größer als 4000 µm sind. Bezüglich dieser Verteilung konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Soja-Sorte oder vom Rhizobienstamm (effektiv) festgestellt werden.

Die ineffektiven Knöllchen der Sorte Caloria (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24) werden nicht größer als 2800 µm, und der Hauptgewichts- und Zahlenanteil bleibt bedingt durch den stetigen Knöllchenzuwachs in der kleinsten Größenklasse (Abb. 12). Die Größenverteilung des jüngsten Stadiums ähnelt jedoch sehr jener der effektiven Knöllchen. Das in Abb. 8 demonstrierte größere mittlere Frischgewicht ineffektiver Knöllchen bei der Sorte Mandarin wirkt sich auch auf die Größenverteilung aus. Die Knöllchen werden etwas größer als bei der Sorte Caloria, aber überschreiten nicht 3300 µm Durchmesser (ohne Abbildung). Hier liegt also ein sortenspezifischer Unterschied vor.

3.2.3. Wirkung verschiedener Perlite-Sorten auf das Wachstum

Neben dem üblicherweise verwendeten Agriperl-Pflanzenperlite wurden drei andere Perlite-Sorten mit verschiedenen Körnungsgrößen getestet (s. 2.3.), um den Einfluß von Wasseraufnahmekapazität und Atmungsfähigkeit des Bodens auf die Knöllchenentwicklung zu untersuchen. In Tab. 3 werden die unterschiedlichen Wasseraufnahmekapazitäten der Perlite-Sorten miteinander verglichen. Pro Sorte wurde der Mittelwert aus sechs mit Perlite gefüllten Töpfen (oben: 8 cm Innendurchmesser; unten: 4 cm Innendurchmesser; Höhe: 8 cm; Volumen: etwa 235 ml) gebildet. Außerdem wird der Wasserverlust zwischen zwei Gießzeitpunkten (48 h

in Klimakammer) angegeben.

Tab. 3: Wasseraufnahmekapazitäten und Wasserverlust verschiedener Perlite-Sorten

Perlite-Sorte	Aufnahmekapazität	Wasserverlust nach 48 h	Wasserverlust in % der Aufnahmekapazität
Agriperl	93,72 g (78 %)	19,37 g	21 %
Superlite 0/5	58,08 g (49 %)	20,70 g	36 %
Superlite 0/3	111,47 g (93 %)	22,75 g	20 %
Superlite 0/1	119,42 g (100 %)	20,07 g	17 %

Aus Tab. 3 ist ersichtlich, daß die Aufnahmekapazität von Superlite 0/5 nur halb so groß ist wie die von Superlite 0/1, während Agriperl und Superlite 0/3 mittlere Werte zeigen. Der absolute Wasserverlust ist bei allen vier Perlite-Sorten aufgrund derselben Verdunstungsoberfläche gleich; er beträgt jedoch nach 48 h bei Superlite 0/5 36 % und bei den übrigen Sorten zwischen 17 und 21 % der Aufnahmekapazität.

In Tab. 4 wird der Einfluß der Perlite-Sorten auf die Knöllchenentwicklung gezeigt. Der Infektions- und Gießmodus wurden dafür noch mehr spezifiziert. Unter dem Abschnitt "Normale Bedingungen" sind zwei Versuchsserien aufgeführt. In jeder Serie wurde die Sorte Mandarin (15 Tage alte Pflanzen) mit einem bestimmten Titer (Lebendzellzahl) von Rhizobium japonicum 61-A-101 infiziert (Titer x Pflanze^{-1} : 1) 8,43 x 10^3 Zellen x ml^{-1}; 2) 6,98 x 10^3 Zellen x ml^{-1}). Der Titer wurde so gewählt, daß er knapp unter dem Sättigungswert für die Ausbildung maximaler Knöllchenzahl lag.

Tab. 4: Einfluß verschiedener Perlite-Sorten auf die Knöllchenentwicklung und das oberirdische Pflanzenwachstum. Objekt: Glycine max var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101. Nähere Einzelheiten siehe Text.

Perlite-Sorte	Sproßhöhe (cm)	Sproß-Frischgewicht (g)	mittl. Kn.-zahl x Pflanze^{-1}	Gesamtzahl x 30 Pfl.$^{-1}$	mittl. Gewicht x Knöllchen^{-1} (mg)	Gesamtgewicht x 30 Pfl.$^{-1}$ (g)
Normale Bedingungen						
1) Agriperl	34,53 ∓3,46	1,77 ∓0,37	21 ∓8	616	5,76 ∓1,32	3,47
Superlite 0/5	35,08 ∓3,74	1,77 ∓0,30	14 ∓6	425	6,74 ∓2,92	2,62
Superlite 0/3	35,97 ∓2,41	1,84 ∓0,33	19 ∓8	560	6,94 ∓3,92	2,83
Superlite 0/1	36,22 ∓3,67	1,96 ∓0,42	22 ∓8	646	5,73 ∓2,32	3,39
2) Superlite 0/5			6 ∓5	178	14,95 ∓14,66	2,05
Superlite 0/3			7 ∓6	190	9,32 ∓4,92	1,51
Superlite 0/1			15 ∓7	433	8,43 ∓6,16	3,01
Wasser-Stress-Bedingungen						
Agriperl	30,11 ∓3,27	1,01 ∓0,23	9 ∓4	265	3,15 ∓1,88	0,78
Superlite 0/5	30,85 ∓2,83	0,97 ∓0,17	6 ∓5	185	2,27 ∓1,03	0,38
Superlite 0/3	32,65 ∓3,42	1,21 ∓0,20	11 ∓6	341	2,64 ∓1,10	0,78
Superlite 0/1	33,91 ∓3,38	1,27 ∓0,30	18 ∓12	529	3,34 ∓1,59	1,60

Die Pflanzen unter 1) wurden am 2. und 3. Tag nach der Infektion mit 15 ml Leitungswasser x Topf^{-1} und ab dem 4. Tag mit 40 ml Leguminosen-Nährlösung (jeden 2. Tag; s. 2.3.) gegossen. Die Pflanzen unter 2) wurden ab dem 4. Tag mit 40 ml Leguminosen-Nährlösung x Topf^{-1} gegossen. Die unter "Wasserstressbedingungen" angezogenen Pflanzen (Titer wie 1)) wurden ab dem 4. Tag mit 40 ml Leguminosen-Nährlösung x Topf^{-1} und dann nur noch jeden 4. Tag gegossen. Die Knöllchen der unter Normalbedingungen (1)) und unter Wasserstressbedingungen angezogenen Pflanzen waren zum Zeitpunkt der Ernte 21 Tage alt, die der zweiten normal angezogenen Serie 23 Tage, d.h. die Knöllchen befanden sich noch in der Wachstumsphase. Die Stichprobengröße für alle Versuche betrug 30 Pflanzen. Die Versuche in

Tab. 4 stellen die letzten von jeweils drei Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen dar.

Die mittlere Knöllchenzahl pro Pflanze nimmt bei den unter Normalbedingungen in Superlite angezogenen Soja-Pflanzen um so mehr zu, je feiner die Körnung wird, während es sich bei dem mittleren Knöllchengewicht eher umgekehrt verhält. Der Feuchtigkeitsgehalt des Bodens hat wahrscheinlich einen Einfluß auf die Überlebens- oder Infektionsfähigkeit der Rhizobien. Diese Annahme wird durch den zweiten Versuch erhärtet, der allgemein weniger Knöllchen x Pflanze^{-1} lieferte, nachdem erst am 4. Tag nach der Infektion gegossen wurde. Die Verteilungen der Knöllchen des zweiten Versuchs (Abb. 13) zeigen, daß trotz des geringeren mittleren Knöllchengewichts Superlite 0/1 gegenüber den anderen Sorten überlegen ist. Agriperl mit seiner etwas unspezifischeren Körnung liefert hohe Werte.

Bei den unter Wasserstressbedingungen angezogenen Pflanzen wird die Überlegenheit von Superlite 0/1 sowohl in bezug auf die mittlere Knöllchenzahl pro Pflanze als auch auf das mittlere Knöllchen-Frischgewicht noch deutlicher; die bessere Wasseraufnahmekapazität wirkt sich auch positiv auf das Sproßwachstum aus. Die Verteilungsdiagramme (Abb. 14) lassen zusätzlich erkennen, daß gegenüber Versuch 1 (normale Bedingungen) nicht nur die Knöllchenzahl reduziert, sondern auch das Wachstum gebremst ist; die Knöllchen werden nicht größer als 3300 µm.

3.3. Trockengewichtsanteil, C-, H- und N-Gehalt

Der Trockengewichtsanteil vom Frischgewicht (Abb. 15) nimmt bei effektiven Knöllchen der Sorte Mandarin (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101) vom 15. bis zum 35. Tag von etwa 14 % bis etwa 20 % zu und fällt innerhalb der folgenden 15 Tage nur noch leicht ab (etwa 2 %). Bei den ineffektiven Knöllchen derselben Sorte (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24) ist nur ein kurzfristiger Anstieg bis zum 19. Tag um 4 % auf etwa 18 % zu verzeichnen; danach

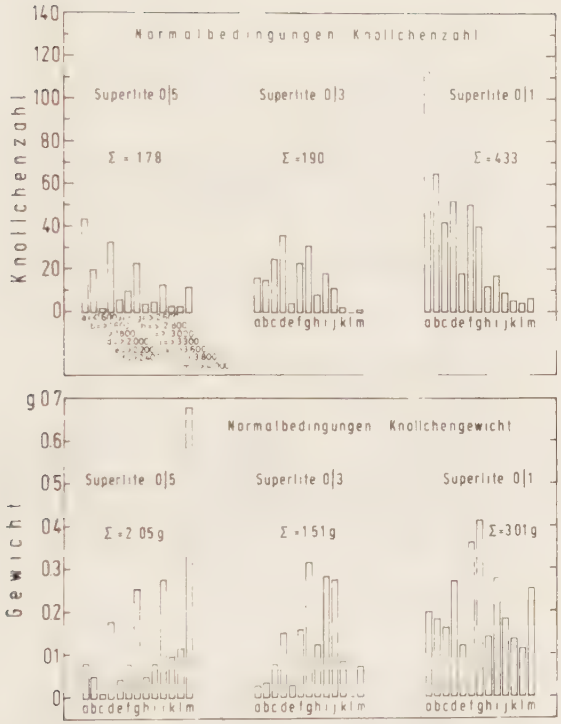


Abb. 13: Größenverteilungsdiagramme (in Abhängigkeit vom Knöllchengewicht und von der Knöllchenzahl) der Knöllchen von in verschiedenen Perlite-Sorten unter Normalbedingungen gewachsenen Soja-Pflanzen (nähere Angaben s. Tab. 4: Normale Bedingungen: 2)). Weitere Einzelheiten siehe Text.

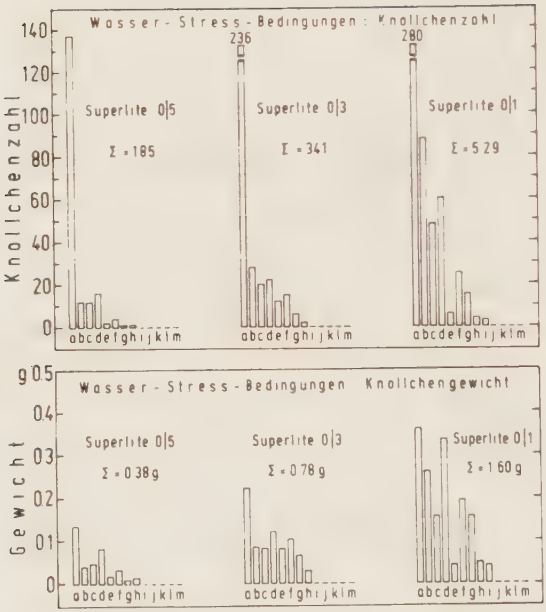


Abb. 14: Größenverteilungsdiagramme (in Abhängigkeit vom Knöllchengewicht und von der Knöllchenzahl) der Knöllchen von in verschiedenen Perlite-Sorten unter Wasser-Stress-Bedingungen gewachsenen Soja-Pflanzen (nähere Angaben s. Tab. 4: Wasser-Stress-Bedingungen).

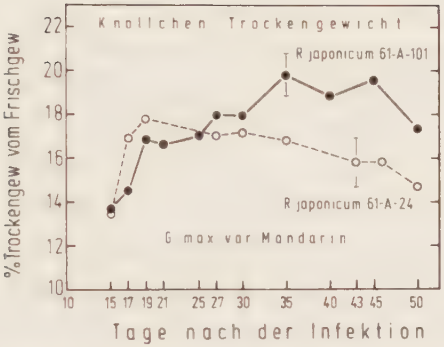


Abb. 15: Der Trockengewichtsanteil vom Frischgewicht in % während der Entwicklung von Glycine max var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101 bzw. 61-A-24.

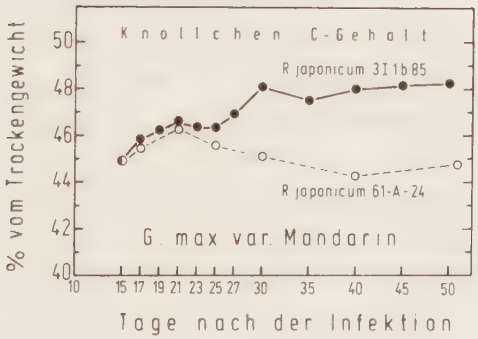


Abb. 16: Der C-Gehalt (in % vom Trockengewicht) während der Entwicklung von Glycine max var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 3I1b85 bzw. 61-A-24.

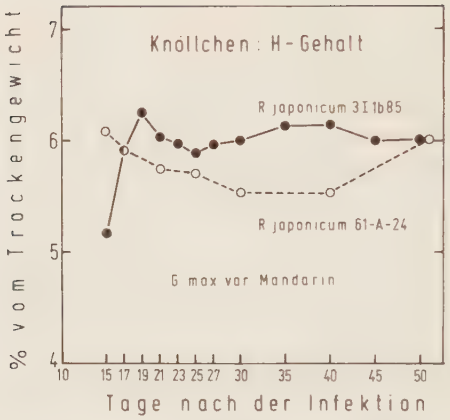


Abb. 17: Der H-Gehalt (in % vom Trockengewicht) während der Entwicklung von Glycine max var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 3I1b85 bzw. 61-A-24.

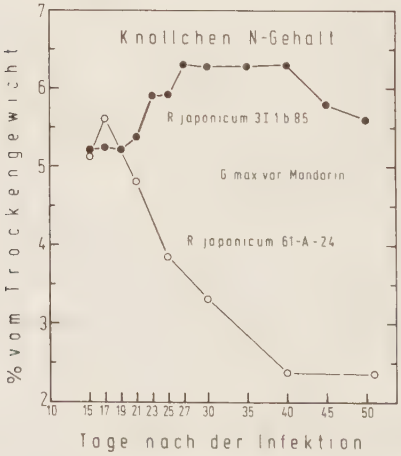


Abb. 18: Der N-Gehalt (in % vom Trockengewicht) während der Entwicklung von Glycine max var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 3I1b85 bzw. 61-A-24.

fällt der Anteil kontinuierlich bis zum 50. Tag um etwa 3 % wieder ab. Die Meßpunkte stellen Mittelwerte aus drei Versuchsserien dar (auf der Grundlage von jeweils 10 Pflanzen). Zum Vergleich wurden von fünf Wurzeln der Sorte Mandarin (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101), von denen am 28. Tag nach der Infektion alle Knöllchen entfernt worden waren, die Trockengewichtsanteile vom Frischgewicht bestimmt; der Mittelwert betrug 7,35 ± 0,34 %.

Der C-, H- und N-Gehalt wurden von Knöllchen der Sorte Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 3I1b85 oder 61-A-24, bestimmt und in % vom Trockengewicht angegeben. Der C-Gehalt (Abb. 16) ist während der Entwicklung ähnlich dem Verlauf der Trockengewichtsanteile (Abb. 15). Wie in Abb. 15 trennen sich die Kurven etwa um den 25. Tag, wobei die ineffektiven Knöllchen zwischen dem 30. und 50. Tag zwischen 3 und 4 % weniger C-Anteil aufweisen als die effektiven, die über 48 % erreichen. Insgesamt gesehen, nimmt der C-Gehalt der effektiven Knöllchen (von etwa 45 %) stetig zu und erreicht ein Plateau (48 %), während jener der ineffektiven Knöllchen nur kurzfristig zunimmt (von etwa 45 - 46 %) und dann abfällt (44 - 45 %).

Der H-Gehalt (Abb. 17) der ineffektiven Knöllchen liegt in fast allen Punkten etwas niedriger (5,5 - 6 %) als jener der effektiven (um 6 %; außer dem knapp bei 5 % liegenden Meßwert); die Kurven lassen keine deutliche Tendenz erkennen.

Die N-Gehalte (Abb. 18) unterscheiden sich deutlich voneinander. Bei den effektiven Knöllchen steigt der N-Anteil bis zum 27. Tag an (um etwa 1 % auf knapp über 6 %), bleibt auf einem Plateau und fällt nach dem 40. Tag nicht unter 5,5 %. Bei den ineffektiven Knöllchen ist nach anfänglich hohen Werten zwischen 5 und 5,5 % ein starker Abfall schon ab dem 17. Tag um etwa 3 % auffällig.

Zum Vergleich wurde der C-, H- und N-Gehalt von Wurzelgewebe ohne Knöllchen (Glycine max var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 3I1b85) am 27. Tag nach der Infektion bestimmt:

44,44 % C
5,30 % H
2,03 % N

Auffällig ist, daß der C-, H- und N-Gehalt von nichtinfiziertem Wurzelgewebe den Werten von älteren ineffektiven Knöllchen ähnelt.

3.4. Proteingehalt

Der Proteingehalt der Cytoplasmaextrakte (bezogen auf 1 g Knöllchen-Frischgewicht) ist sowohl in effektiven als auch in ineffektiven Knöllchen der Sorten Mandarin und Caloria in den frühen Stadien am höchsten (zwischen 9 und 15 mg) und fällt dann bis zum 50. Tag auf unter 4 mg ab (Abb. 19). Die Werte der ineffektiven Knöllchen liegen erst ab dem 23. Tag fast immer unter denen der stärker schwankenden effektiven Knöllchen.

In Abb. 20 wird das pro g Knöllchen-Frischgewicht aus Bakteroiden extrahierte lösliche Protein von effektiven und ineffektiven Knöllchen miteinander verglichen. Diese Werte können nur Hinweise auf den tatsächlichen Gehalt sein, da während des Aufschlusses der Knöllchen die Bakteroiden nicht quantitativ erfaßt werden. Da die Aufschlüsse aber relativ gleich sind und somit auch relativ ähnliche Verluste an Bakteroiden ergeben und außerdem der Unterschied zwischen effektiven und ineffektiven Knöllchen hier besonders auffällig ist, sollen die Ergebnisse dennoch dargestellt werden.

Am 15. Tag liegen die Werte (Abb. 20) sowohl bei den effektiven als auch bei den ineffektiven Bakteroiden zwischen 1 und 2 mg Protein pro g Knöllchen-Frischgewicht. Im Laufe der Entwicklung aktiver Knöllchen der Sorten Mandarin und Caloria nimmt der Proteinanteil erheblich zu und erreicht bei der Sorte Mandarin am 30. Tag und bei der Sorte Caloria am 40. Tag den höchsten Wert (8 - 9 mg pro g Knöllchen-Frischgewicht). Danach fallen die Werte auf 5 - 6 mg ab. Die Werte der ineffektiven Knöllchen fallen während der gesamten Entwicklung, von 1 mg am 15. Tag ausgehend, allmählich ab; für die Sorte Caloria liegen die Meßpunkte fast immer etwas über denen der Sorte Mandarin. Die Ergebnisse in den Abbildungen 19 und 20 stammen von der letzten von jeweils mindestens drei ähnlich verlaufenen Serien.

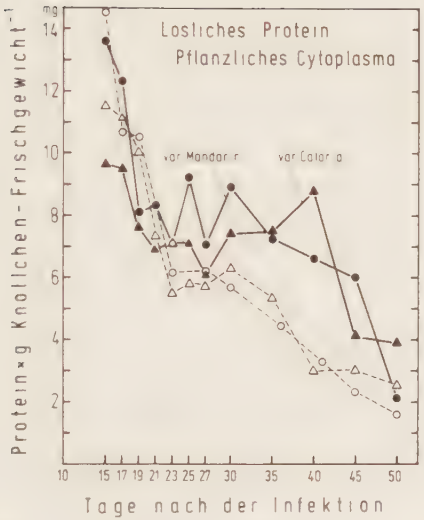


Abb. 19: Der Proteingehalt der Cytoplasmaextrakte (bezogen auf g Knöllchen-Frischgewicht) von Knöllchen während der Entwicklung von Glycine max var. Caloria und var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101 (●——●;▲——▲) bzw. 61-A-24 (○----○;△----△).

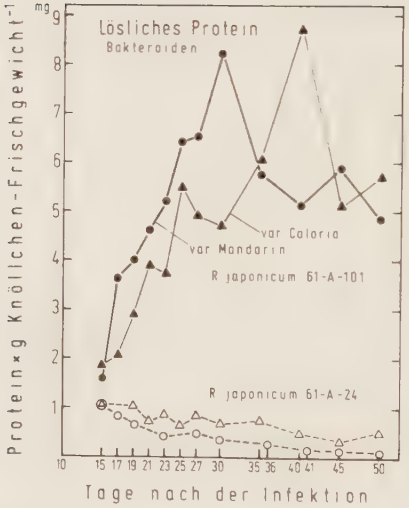


Abb. 20: Der Gehalt an aus Bakteroiden extrahiertem löslichem Protein (bezogen auf g Knöllchen-Frischgewicht) während der Entwicklung von Glycine max var. Caloria und Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101 bzw. 61-A-24.

3.5. Nitrogenase-Aktivitäten

3.5.1. Abhängigkeit pro Frischgewichtseinheit und pro Pflanze

Die Nitrogenase-Aktivität in den Sorten Caloria und Chippewa 64 erreicht zwischen dem 15. und 21. Tag schnell ein Maximum von 13 ± 3 nmol $C_2H_4 \times h^{-1} \times$ mg Knöllchen-Frischgewicht^{-1}. Während der folgenden 6 - 8 Tage fällt sie auf Werte zwischen 5 und 6 nmol ab (Abb. 21 und 27). In der Sorte Mandarin durchläuft die Aktivität ein höheres Maximum (18 ± 4 nmol) und fällt nicht vor dem 27. Tab ab. In allen drei Sorten folgt eine Periode gleichbleibend niedriger Aktivitäten (Abb. 21 und 27). Vom 45. bis 50. Tag nach der Infektion fällt die Aktivität erneut (Abb. 27). Die Aktivitätsmaxima sind bei den Sorten Caloria und Chippewa 64 immer spitz und bei der Sorte Mandarin breit. Je nach Versuchsserie können die absoluten Werte bei allen drei Sorten auch überschritten werden (vergl. Aktivitäten in der Sorte Caloria: Abb. 21 und 27); die Lage kann sich ebenfalls um wenige Tage verschieben. Die Blüte beginnt bei allen Sorten einige Tage vor Erreichen des Maximums und endet bei Caloria und Chippewa 64 mit ihm; bei Mandarin dauert sie 1 - 2 Tage länger. Die Infektion derselben Sorten mit einem anderen Stamm von Rhizobium japonicum (3I1b85) ergibt dieselben Ergebnisse (Abb. 22).

Die Darstellung der Aktivitäten pro Pflanze divergiert kaum von jener bezogen auf mg Knöllchen-Frischgewicht. Die Kurven (Abb. 23 und 24) sind von demselben steilen Aktivitätsanstieg geprägt und durchlaufen ähnliche frühe Maxima (bis 3700 nmol in Mandarin und unter 2700 nmol in Caloria und Chippewa 64). Der Abfall ist verglichen mit den Aktivitäten bezogen auf mg Knöllchen-Frischgewicht etwas reduziert (Abb. 25 und 26). Der Unterschied erklärt sich aus der durch das Wachstum verursachten Gewichtszunahme der Knöllchen pro Pflanze.

Die Nitrogenase-Aktivitätsmessungen der mit dem ineffektiven Stamm von Rhizobium japonicum (61-A-24) infizierten Sorten Caloria

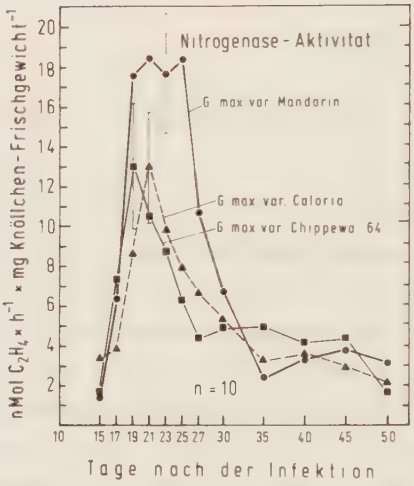


Abb. 21: Die Nitrogenase-Aktivität (pro mg Knöllchen-Frischgewicht) während der Knöllchenentwicklung von drei Sorten von Glycine max, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 10 Pflanzen.

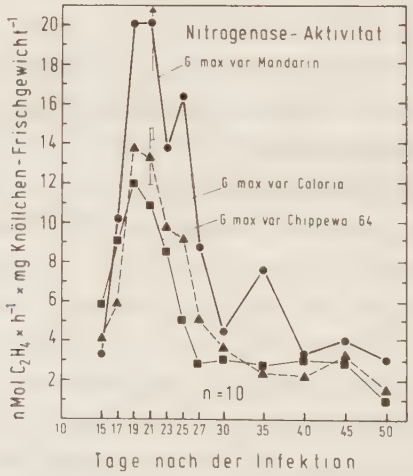


Abb. 22: Die Nitrogenase-Aktivität (pro mg Knöllchen-Frischgewicht) während der Knöllchenentwicklung von drei Sorten von Glycine max, infiziert mit Rhizobium japonicum 3I1b85. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 10 Pflanzen.

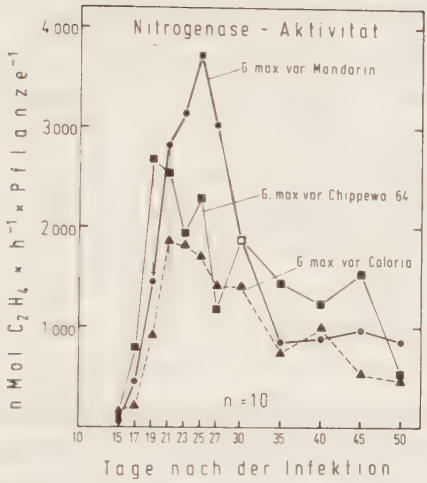


Abb. 23: Die Nitrogenase-Aktivität (pro Pflanze) während der Knöllchenentwicklung von drei Sorten von Glycine max, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 10 Pflanzen.

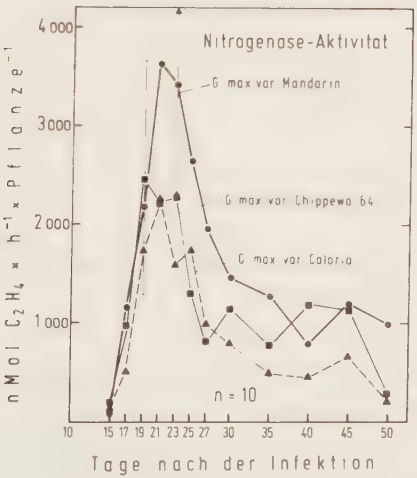


Abb. 24: Die Nitrogenase-Aktivität (pro Pflanze) während der Knöllchenentwicklung von drei Sorten von Glycine max, infiziert mit Rhizobium japonicum 3I1b85. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 10 Pflanzen.

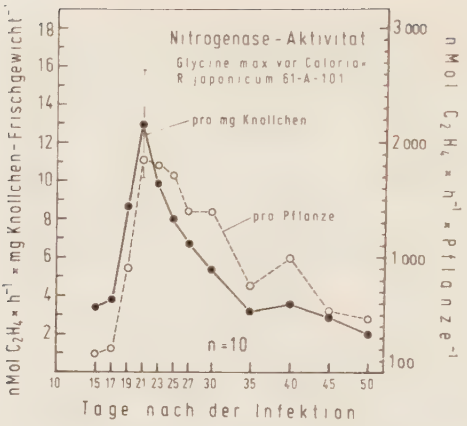


Abb. 25: Die Nitrogenase-Aktivität (pro mg Knöllchen-Frischgewicht und pro Pflanze) während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 10 Pflanzen.

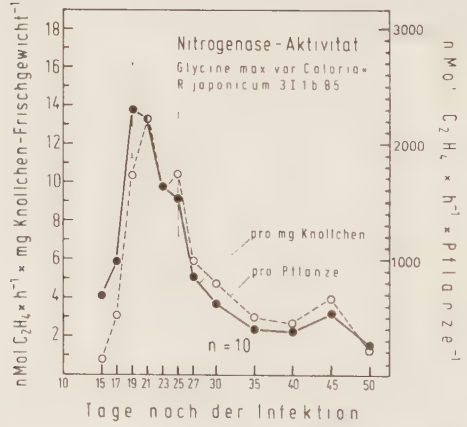


Abb. 26: Die Nitrogenase-Aktivität (pro mg Knöllchen-Frischgewicht und pro Pflanze) während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 3I1b85. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 10 Pflanzen.

und Mandarin ergaben, daß zu keinem Zeitpunkt während der Knöllchenentwicklung Aktivitäten meßbar waren. Die Blütezeiten lagen in denselben Zeiträumen wie bei den Nitrogenase-aktiven Sorten.

Von den Soja-Sorten, die mit effektiven Rhizobien infiziert wurden, dienten Caloria und Mandarin (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101) aufgrund ihrer unterschiedlichen Nitrogenase-Aktivitätsmaxima (in bezug auf Höhe und Lage) und anderer schon genannter Kriterien (s. 3.1.) zu den enzymatischen Analysen.

3.5.2. Abhängigkeit von der Tageszeit

Um eventuelle tagesrhythmische Schwankungen der Nitrogenase-Aktivität und damit verbundene physiologische Unterschiede in den Knöllchen auszuschließen, wurden die Knöllchen immer 4 h nach Beginn der Lichtphase geerntet (s. 2.3.). Ein Vergleich mit den Aktivitäten 8 1/2 h nach Beginn der Lichtphase ergab keinen Unterschied sowohl bei der Sorte Mandarin, als auch bei der Sorte Caloria am 21. Tag nach der Infektion mit Rhizobium japonicum 61-A-101:

Sorte	Aktivität (nmol $C_2H_4 \times h^{-1} \times mg$ Knöllchen-Frischgewicht^{-1})	
	4 h	8 1/2 h
	nach Beginn der Lichtphase	
Mandarin	34,42 ± 7,32	35,78 ± 5,71
Caloria	20,24 ± 5,27	18,42 ± 6,17

Die Werte repräsentieren das Mittel aus drei Bestimmungen, mit jeweils 14 Pflanzen.

3.5.3. Abhängigkeit vom O_2-Partialdruck

Werden die Wurzelknöllchen in einer 40 % (v/v) O_2-Atmosphäre, im Gegensatz zu dem sonst üblichen O_2-Volumenanteil von 19 % (v/v) inkubiert, so werden die Nitrogenase-Aktivitäten (in 19 % O_2) schon nach einer kurzen Phase von wenigen Tagen (Stadium I) übertroffen (Abb. 27). In diesem Stadium II, das sich über etwa 20 Tage erstreckt,

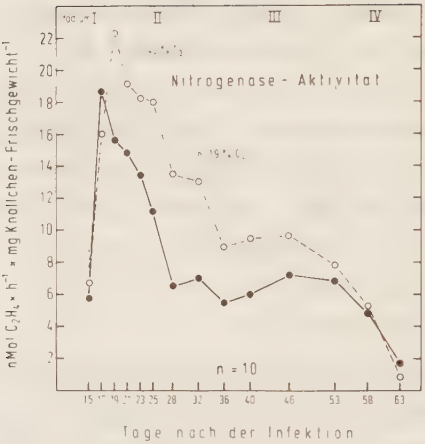


Abb. 27: Die Nitrogenase-Aktivität (pro mg Frischgewicht) während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101 nach Inkubation in 19 % (v/v) und 40 % (v/v) O_2-Atmosphäre. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 10 Pflanzen. Die Stadien I bis IV werden im Text beschrieben.

sind um etwa 30 - 100 % höhere Werte meßbar. In der darauffolgenden Zeit (Stadium III) nähern sich die Aktivitäten an und unterscheiden sich dann in der Absterbephase (Stadium IV), wo sie stark abfallen, nicht mehr voneinander. Die in Abb. 27 gezeigten Kurven stellen die letzte Serie von drei jeweils ähnlich verlaufenen Versuchen dar. Die Stichprobengröße betrug 10 Pflanzen pro Versuchstag.

3.6. Leghämoglobingehalt und Absorptionsspektren

Der Leghämoglobingehalt wurde in den Cytoplasmaextrakten (einschließlich der Infektionsvakuoleninhalte) bestimmt und auf 1 g Knöllchen-Frischgewicht bezogen. Während die Nitrogenase-Aktivitäten von Mandarin und Caloria am 21. Tag bereits maximale Werte erreichen,

wurde mit der Pyridin-Hämochrom-Methode zu diesem Zeitpunkt erst die Hälfte der maximalen Leghämoglobin-Konzentration gemessen (Infektion mit Rhizobium japonicum 61-A-101). Die höchsten Werte (Abb. 28) liegen etwa am 35. Tag. Danach fallen die Kurven bis zum 50. Tag ab, wo die Meßpunkte unter denen vom 21. Tag liegen. Der Leghämoglobingehalt nimmt somit nach dem Abfallen der Nitrogenase-Aktivitäten noch zu und fällt erst später deutlich ab. In der Absterbephase werden grüne Abbauprodukte des Leghämoglobins innerhalb der Knöllchen sichtbar. Im Gegensatz zu den Nitrogenase-Aktivitätskurven sind die gemessenen Leghämoglobin-Konzentrationen bei beiden Soja-Sorten relativ ähnlich. Die höchsten gefundenen absoluten Werte (für Mandarin am 30. Tag: 0,222 µmol x g Frischgewicht^{-1}; für Caloria am 35. Tag: 0,212 µmol x g Frischgewicht^{-1}) liegen unter denen von BERGERSEN and GOODCHILD (1973b) angegebenen (z.B. 0,293 µmol x g Frischgewicht^{-1} für 36 Tage alte Knöllchen und 0,363 µmol x g Frischgewicht^{-1} für 43 Tage alte Knöllchen der Sorte Lincoln; aus den dort angegebenen Daten errechnet). Der Unterschied könnte einerseits in der Verwendung verschiedener Soja-Sorten zu suchen sein, andererseits beruhen die Messungen hier auf der Bestimmung des Leghämoglobingehalts aus den Cytoplasma-extrakten (einschließlich Vesikelinhalt), die auf einer vorsichtigen Fraktionierung der Knöllchen basiert, um die Bakteroiden nicht zu zerstören. Die in Abb. 28 gezeigten Ergebnisse stellen die letzte Serie von drei relativ gleich verlaufenen Versuchen dar. Der Leghämoglobingehalt bestimmter Größenklassen der Knöllchen während der Entwicklung wird in Kap. 3.10. dargestellt.

Ineffektive Knöllchen zeigten zu keinem Zeitpunkt rote Farbstoffe im Extrakt. Der Pyridin-Hämochrom-Test lieferte trotzdem geringe, fast gleichbleibende Werte während der gesamten Entwicklung der Sorten Mandarin und Caloria (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24): z.B. 0,0237 $\pm$ 0,0052 µmol x g Knöllchen-Frischgewicht^{-1} (Sorte Caloria). Die Ursache dafür ist möglicherweise eine dem Leghämoglobin verwandte Verbindung. Absorptionsspektren von pflanzlichen Cytoplasmaextrakten ineffektiver Knöllchen besitzen zwar die für alle Tetrapyrrole (in

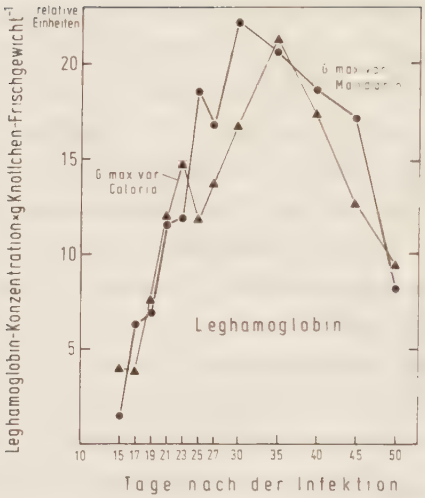


Abb. 28: Leghämoglobingehalt (relative Einheiten: s. 2.8.) pro g Knöllchen-Frischgewicht während der Entwicklung von Glycine max var. Caloria und var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-10¹. Die Stichprobengröße pro Versuchstag betrug 10 Pflanzen.

denen der Kern vollständig konjugiert ist) typische Soret-Bande (SMITH, 1975) bei 400 nm, aber zu keinem Erntezeitpunkt wurden die für effektive Knöllchen typischen α- und ß-Banden (bei 575 nm und 540 nm) des oxidierten Leghämoglobins gefunden (Abb. 29: repräsentatives Spektrum für verschieden alte Knöllchen). Die Soret-Bande ist gegenüber den ineffektiven Knöllchen etwas verschoben (412 nm). Die reduzierte Form des Leghämoglobins, die z.B. bei Erwärmung des Extrakts oder durch Reduktion mit $Na_2S_2O_4$ entsteht, besitzt einen Peak bei 555 nm (ohne Abbildung).

Abb. 29: Repräsentative Absorptionsspektren von pflanzlichen Cytoplasmaextrakten effektiver und ineffektiver Knöllchen.

——— Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101; Aufschluß von 45 Tage alten Knöllchen; Soret-Bande: 412 nm, ß-Bande: 540 nm, α-Bande: 575 nm.

– – – – – Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24; Aufschluß von 40 Tage alten Knöllchen; Soret-Bande: 400 nm.

3.7. Vergleich der Entwicklung spezifischer Aktivitäten von Enzymen im pflanzlichen Cytoplasma und in Bakteroiden von effektiven und ineffektiven Knöllchen

3.7.1. Aspartat-Aminotransferase (AST)

Die spezifischen Aktivitäten der AST im pflanzlichen Cytoplasma effektiver Knöllchen (Abb. 30) durchlaufen in beiden Sorten am 19. Tag nach der Infektion ein Maximum mit 1000 - 1100 m Units. Der Anstieg ist jedoch kurz und beginnt am 15. Tag sehr hoch mit über 800 m Units. In beiden Sorten fallen die Aktivitäten bis etwa zum 35. Tag fast linear ab und schwanken dann in der Absterbephase des Knöllchens zwischen 270 und 450 m Units. In den Bakteroiden ist eine niedrige, langsam abnehmende Aktivität dieses Enzyms feststellbar; auch zwischen dem 35. und 50. Tag ist sie signifikant niedriger als im pflanzlichen Cytoplasma.

In ineffektiven Knöllchen werden in beiden Sorten anfänglich wieder sehr hohe Aktivitäten gefunden (bis etwa 1200 m Units), die während der Knöllchen-Entwicklung bis zum 50. Tag nahezu linear um die Hälfte abnehmen (Abb. 31). In den Bakteroiden ist die sinkende Tendenz wie in den effektiven Knöllchen nicht beobachtbar, und anfänglich liegen die Aktivitäten auch niedriger, als in effektiven Bakteroiden.

Die gefundenen spezifischen Aktivitäten stellen die letzte Serie von drei relativ gleich verlaufenen Versuchen dar. Dies gilt auch für alle anderen Darstellungen in diesem Kapitel (3.7.) und im Kapitel 3.10.

3.7.2. Alanin-Aminotransferase (ALT)

Die ALT-Aktivitäten entwickeln sich ähnlich wie die der AST im pflanzlichen Cytoplasma und in den Bakteroiden effektiver Knöllchen, aber die spezifischen Aktivitäten machen im allgemeinen nur etwa ein Drittel der AST-Aktivitäten aus (Abb. 32). (Die pflanzliche ALT wurde allerdings nur bei 70 % ihrer maximalen Aktivität bestimmt: s. 2.7.2.)

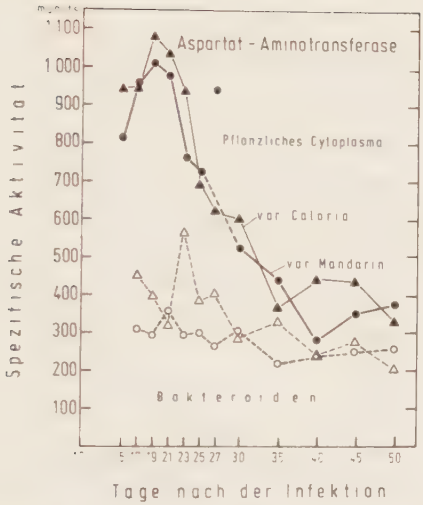


Abb. 30: Spezifische Aktivitäten (nmol Substrat x mg Protein^{-1} x min^{-1}) der Aspartat-Aminotransferase in Bakteroiden (- - - -) und im pflanzlichen Cytoplasma (————) während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Caloria (▲, △) und var. Mandarin (●, ○), infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101.

Im pflanzlichen Cytoplasma ineffektiver Knöllchen (Abb. 33) ist auffällig, daß die ALT-Aktivitäten anfänglich höher liegen und nahezu linear abnehmen, während in effektiven Knöllchen ab etwa dem 30. Tag ein Plateau erreicht wird.

3.7.3. Glutamat-Dehydrogenase (GDH)

Die NADH-abhängige GDH ist im Gegensatz zum NADPH-abhängigen Enzym, das während der gesamten Entwicklungszeit der Knöllchen nur sehr geringe Aktivitäten aufweist, im pflanzlichen Cytoplasma der beiden Soja-Sorten auffällig vertreten. Wie die Transaminasen entwickelt die GDH effektiver Knöllchen ein frühes Maximum von ungefähr 350 m Units (Abb. 34). Zwischen dem 30. und 50. Tag schwanken die Werte zwischen

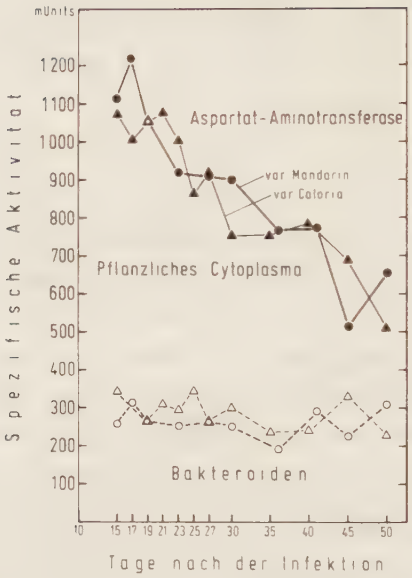


Abb. 31: Spezifische Aktivitäten (nmol Substrat x mg Protein^{-1} x min^{-1}) der Aspartat-Aminotransferase in Bakteroiden (- - - -) und im Pflanzlichen Cytoplasma (————) während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Caloria (▲,△) und var. Mandarin (●,○), infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24.

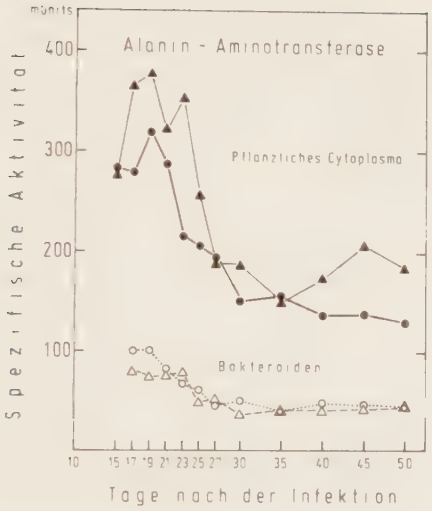


Abb. 32: Spezifische Aktivitäten der Alanin-Aminotransferase während der Entwicklung effektiver Knöllchen von Glycine max. Zeichen wie in Abb. 30.

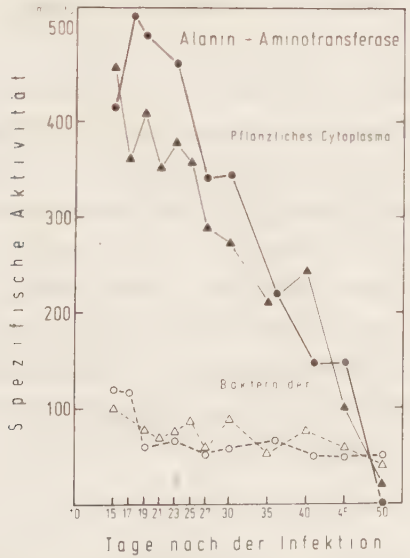


Abb. 33: Spezifische Aktivitäten der Alanin-Aminotransferase während der Entwicklung ineffektiver Knöllchen von Glycine max. Zeichen wie in Abb. 31.

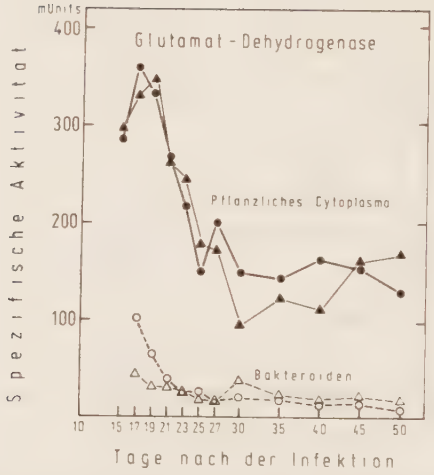


Abb. 34: Spezifische Aktivitäten der Glutamat-Dehydrogenase während der Entwicklung effektiver Knöllchen von Glycine max. Zeichen wie in Abb. 30

100 und 170 m Units. Bei diesem Enzym wurden im pflanzlichen Cytoplasma anderer Versuchsserien in früheren Knöllchenstadien auch um etwa 100 m Units niedrigere Aktivitäten gefunden. Die sehr niedrigen Aktivitäten der GDH (NADH-abhängig) in den Bakteroiden stellen nur einen kleinen Teil der Aktivitäten des pflanzlichen Enzyms dar. In jungen Knöllchen sind jedoch höhere Aktivitäten meßbar. (Abb. 34).

Die GDH in ineffektiven Knöllchen zeigt sowohl im pflanzlichen Cytoplasma als auch in den Bakteroiden eine ähnliche Tendenz, fällt aber in der pflanzlichen Fraktion etwas weiter ab (Abb. 35).

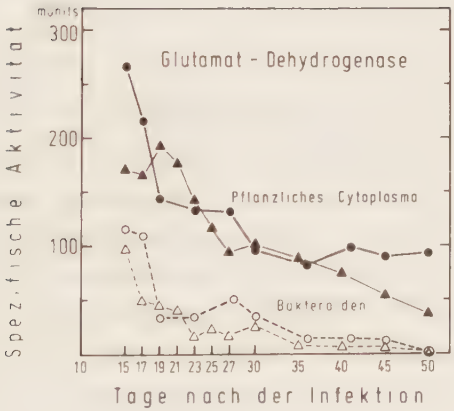


Abb. 35: Spezifische Aktivitäten der Glutamat-Dehydrogenase während der Entwicklung ineffektiver Knöllchen von Glycine max. Zeichen wie in Abb. 31.

3.7.4. Alanin-Dehydrogenase (ADH)

Die nur in den Bakteroiden lokalisierte ADH ist NADH-abhängig. In beiden Soja-Sorten (effektive Knöllchen) steigen die Aktivitäten bis zum 30. Tag steil an und erreichen Werte um 280 m Units (Abb. 36). Dann divergieren die Kurven. Die spezifischen Aktivitäten von Bakteroiden aus der Sorte Mandarin bleiben bis zum 50. Tag auf einem höheren Niveau von etwa 300 m Units, während jene der Sorte Caloria auf etwa 200 m Units fallen.

In den Bakteroiden aus ineffektiven Knöllchen (Abb. 37) beider Soja-Sorten ist auch ein Aktivitätsanstieg der ADH meßbar. Ein Vergleich der höchsten absoluten Werte mit Abb. 36 macht jedoch deutlich, daß die ADH aus ineffektiven Knöllchen nur etwa 1/6 der Aktivität in effektiven Knöllchen erreicht.

3.7.5. 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (3-HBDH)

Die 3-HBDH ist ebenfalls ein rein bakterielles Enzym. Wie bei der ADH nehmen die Aktivitäten nach dem Maximum der N_2-Fixierungsaktivität bis zum 50. Tag nach der Infektion signifikant zu (Abb. 38). Aber die spezifischen Aktivitäten in Bakteroiden der Sorte Caloria liegen signifikant höher als in Bakteroiden der Sorte Mandarin. Vergleicht man die Ergebnisse aus Abb. 36 und Abb. 38, so wird deutlich, daß der Unterschied zwischen den Bakteroiden-Enzymen in den beiden Soja-Sorten nicht durch einen signifikanten Unterschied im Bezugswert Protein bedingt sein kann.

Die 3-HBDH in ineffektiven Knöllchen (Abb. 39) erreicht in beiden Soja-Sorten (nach einem anfänglichen Anstieg der spezifischen Aktivitäten) nur halb so hohe Werte wie in effektiven. Auffällig ist gegenüber den Bakteroiden aus effektiven Knöllchen, daß die Aktivitäten in älteren Knöllchen-Stadien abfallen. Die Aktivitäten in der Sorte Caloria liegen wieder etwas höher als die in der Sorte Mandarin.

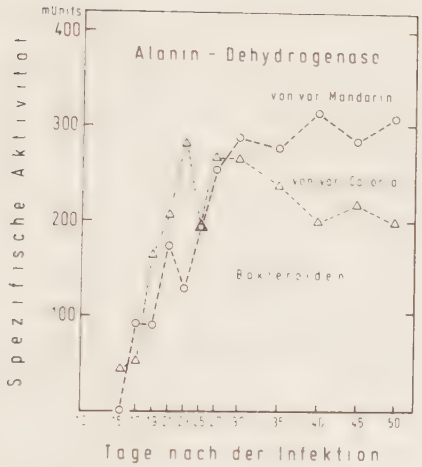


Abb. 36: Spezifische Aktivitäten (nmol Substrat x mg Protein^{-1} x min^{-1}) der Alanin-Dehydrogenase in Bakteroiden während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Caloria (△) und var. Mandarin (○), infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101.

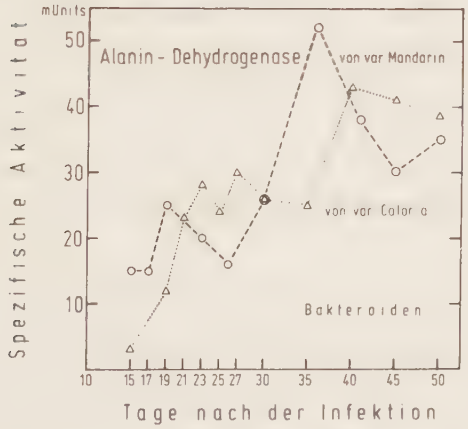


Abb. 37: Spezifische Aktivitäten (nmol Substrat x mg Protein^{-1} x min^{-1}) der Alanin-Dehydrogenase in Bakteroiden während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Caloria (△) und var. Mandarin (○), infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24.

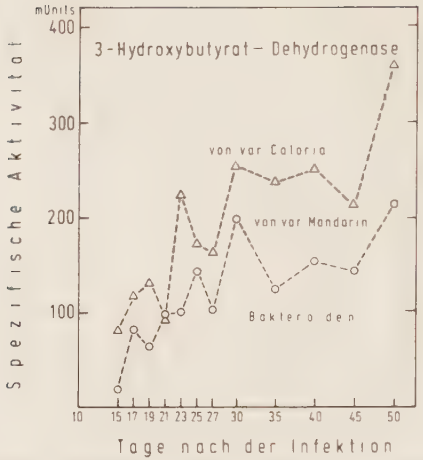


Abb. 38: Spezifische Aktivitäten der 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase in Bakteroiden während der Entwicklung effektiver Knöllchen von Glycine max. Zeichen wie in Abb. 36.

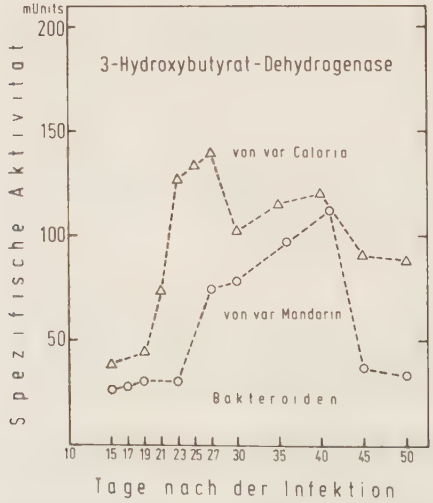


Abb. 39: Spezifische Aktivitäten der 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase in Bakteroiden während der Entwicklung ineffektiver Knöllchen von Glycine max. Zeichen wie in Abb. 37.

3.7.6. Glutamat-Synthase

Die NADH-abhängige Glutamat-Synthase zeigte deutliche Aktivitäten, während die NADPH-abhängige in den Bakteroiden wie auch im pflanzlichen Cytoplasma nicht nachweisbar war. Die GOGAT-Aktivität ist 2 - 3 mal höher in Bakteroiden als im pflanzlichen Cytoplasma beider Sorten und zeigt eine leichte Tendenz der Zunahme während der Knöllchenentwicklung (Abb. 40).

In ineffektiven Knöllchen wurde bei demselben Verlauf in Bakteroiden eine noch geringere Aktivität (5 mUnits und darunter) im pflanzlichen Cytoplasma gefunden (Abb. 41).

3.7.7. Glutamin-Synthetase

3.7.7.1. Mn^{2+}-abhängiger Transferase-Test

Die GS-Aktivitäten wurden routinemäßig mit Hilfe des Transferase-Tests bestimmt (s. 2.7.2.). Eine ganz andere Entwicklung der spezifischen Aktivitäten im Vergleich mit oben erwähnten Enzymen im pflanzlichen Cytoplasma effektiver Knöllchen zeigt die GS in beiden Sorten (Abb. 42). Von weniger als 200 mUnits am 15. Tag steigt die spezifische Aktivität schnell um das 20-fache bis zum 23. Tag an, und danach noch weiter bis auf 6000 - 7000 mUnits, 45 bis 50 Tage nach der Infektion. Diese Aktivitäten wurden mit dem Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Test bestimmt.

Verglichen mit diesen ungewöhnlich hohen spezifischen Aktivitäten in alten Knöllchen-Zellen, wurden in Bakteroiden effektiver Knöllchen von beiden Soja-Sorten nur 300 - 400 mUnits während der ganzen Knöllchenentwicklung gefunden (Abb. 43). In ganz jungen Knöllchen wurden neben diesen Werten allerdings auch höhere Aktivitäten (bis etwa 700 mUnits) gemessen. Das Verhältnis zwischen dem Mn^{2+}-abhängigen und dem Mn^{2+} + Mg^{2+}-abhängigen Test (s. 2.7.2.) bleibt mit 1,4 $\pm$ 0,2 relativ konstant während der Knöllchenentwicklung.

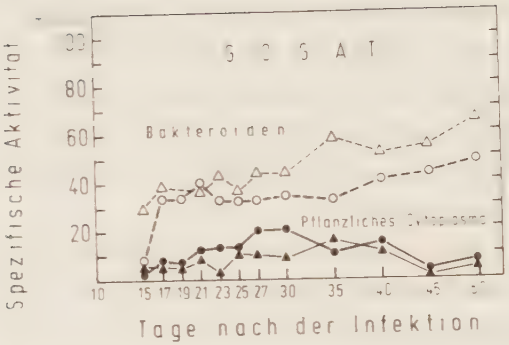


Abb. 40: Spezifische Aktivitäten der Glutamat-Synthase während der Entwicklung effektiver Knöllchen von Glycine max. Zeichen wie in Abb. 30.

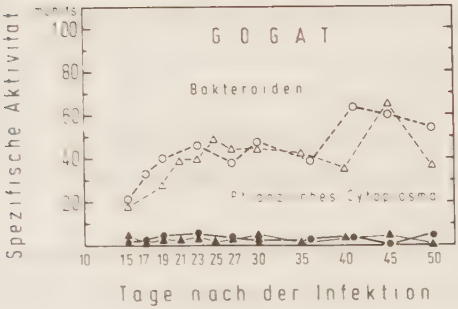


Abb. 41: Spezifische Aktivitäten der Glutamat-Synthase während der Entwicklung ineffektiver Knöllchen von Glycine max. Zeichen wie in Abb. 31.

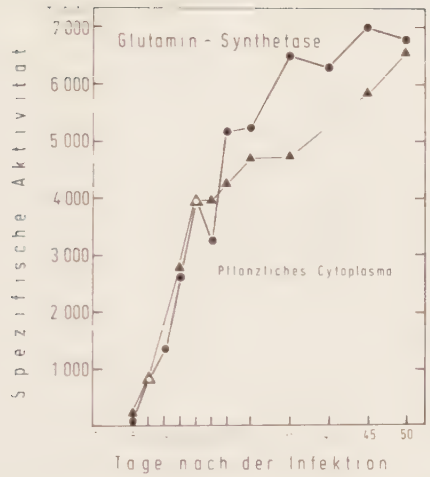


Abb. 42: Spezifische Aktivitäten (nmol Substrat x mg Protein^{-1} x min^{-1}) der Glutamin-Synthetase im pflanzlichen Cytoplasma während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Caloria (▲) und var. Mandarin (●), infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101.

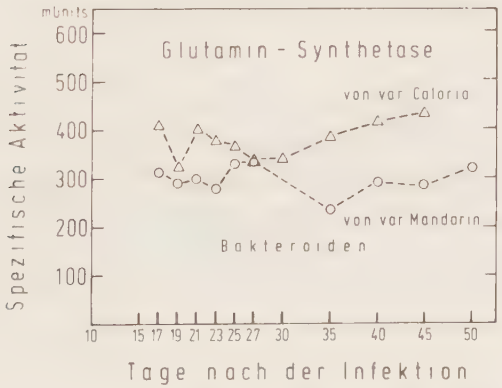


Abb. 43: Spezifische Aktivitäten der Glutamin-Synthetase in Bakteroiden während der Entwicklung effektiver Knöllchen von Glycine max. Zeichen wie in Abb. 36.

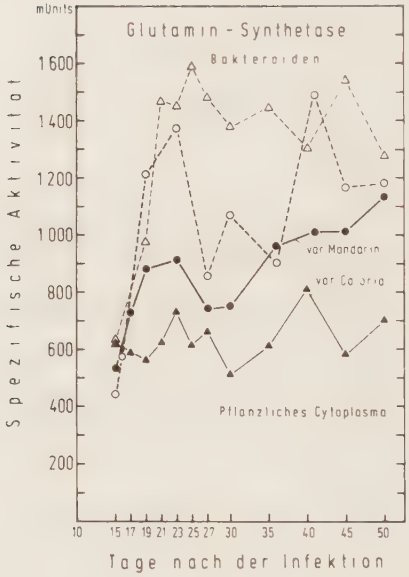


Abb. 44: Spezifische Aktivitäten (nmol Substrat x mg Protein^{-1} x min^{-1}) der Glutamin-Synthetase in Bakteroiden (- - - -) und im pflanzlichen Cytoplasma (———) während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Caloria (▲,△) und var. Mandarin (●,○), infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24.

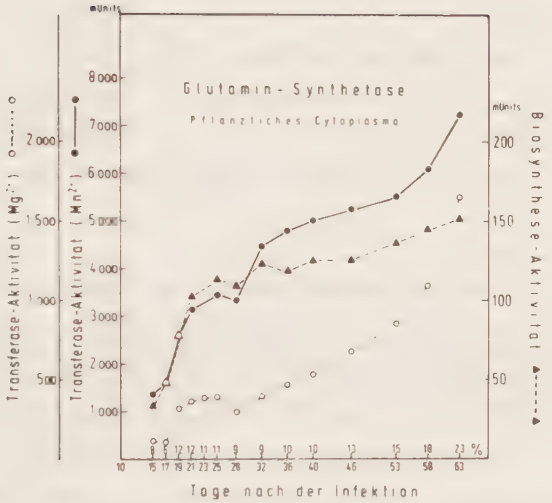


Abb. 45: Spezifische Aktivitäten (nmol Substrat x mg Protein^{-1} x min^{-1}) der Glutamin-Synthetase im pflanzlichen Cytoplasma während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101.

●——● Mn^{2+}-abhängige Transferase-Aktivität

○-----○ Mg^{2+}-abhängige Transferase-Aktivität

▲– – –▲ Mg^{2+}-abhängige Biosynthese-Aktivität

Die %-Zahlen über der Abszisse geben den Anteil der Mg^{2+}-abhängigen von der Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Aktivität an.

GS aus pflanzlichem Cytoplasma ineffektiver Knöllchen erreicht in beiden Soja-Sorten nur 12 - 16 % der höchsten Werte effektiver Knöllchen (Abb. 44). In der Sorte Caloria schwanken die Werte während der gesamten Entwicklung zwischen 500 und 800 mUnits, in Mandarin zwischen 500 und 1100 mUnits (mit leichter Tendenz nach höheren Werten). Die spezifischen Aktivitäten übertreffen also kaum die in 15 - 17 Tage alten effektiven Knöllchen (Abb. 42 und 45) feststellbaren Meßwerte. In der Bakteroiden-Fraktion ist ab dem 15. Tag innerhalb 4 - 5 Tagen ein Aktivitätsanstieg bis zu 1600 mUnits meßbar, danach bleiben die Aktivitäten hoch, schwanken aber stark (Abb. 44).

3.7.7.2. Biosynthese-Test und Mg^{2+}-abhängiger Transferase-Test

Neben dem Transferase-Test wurde die pflanzliche GS auch in der Biosynthese-Richtung untersucht (s. 2.7.2.). Abb. 45 zeigt den typischen Anstieg der nach dem Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Test gemessenen GS (Objekt: Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101). Die nach dem Biosynthese-Test gefundenen spezifischen Aktivitäten der pflanzlichen GS zeigen nahezu denselben Verlauf und betragen während der gesamten Knöllchenentwicklung fast konstant 2,71 $\pm$ 0,41 % der Werte des Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Tests.

Die nach dem Mg^{2+}-abhängigen Transferase-Test gefundenen Daten lassen ebenfalls einen Aktivitätsanstieg der GS erkennen. Der prozentuale Anteil von den nach dem Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Test gefundenen Meßergebnissen steigt jedoch vom 15. bis zum 63. Tag von etwa 6 - 8 % auf 23 % an (Abb. 45).

Die GS aus effektiven Bakteroiden wurde ebenfalls mit Hilfe der Biosynthese-Reaktion getestet, aber nicht während der gesamten Knöllchenentwicklung. Der nach der Biosynthese-Reaktion gefundene Wert (bei 25°C) aus Bakteroiden von 21 Tage alten Knöllchen beträgt 3,99 $\pm$ 1,38 % der Aktivität des Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Tests (331,56 $\pm$ 21,25 mUnits).

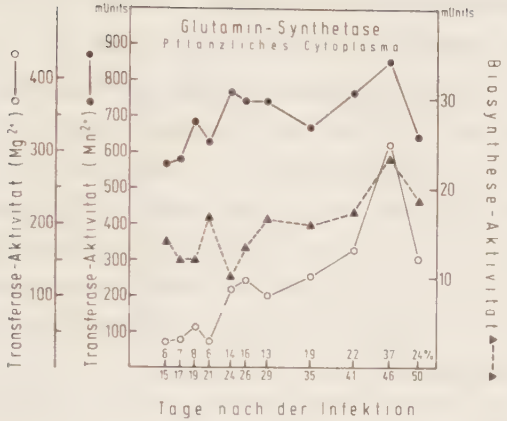


Abb. 46: Spezifische Aktivitäten (nmol Substrat x mg Protein^{-1} x min^{-1}) der Glutamin-Synthetase im pflanzlichen Cytoplasma während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24. Zeichen wie in Abb. 45.

Die pflanzliche GS ineffektiver Knöllchen wurde ebenfalls mit den verschiedenen Tests gemessen. In Abb. 46 ist die Entwicklung der spezifischen Aktivitäten der nach dem Mn^{2+}-abhängigen Test untersuchten GS dargestellt. Die Aktivitäten schwanken zwischen 550 und 850 mUnits. Die aus dem Biosynthese-Test hervorgegangenen Daten stellen wiederum relativ konstant nur 2,28 $\pm$ 0,54 % der spezifischen Aktivitäten des Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Tests dar. Die Mg^{2+}-abhängigen Transferase-Aktivitäten zeigen einen Anstieg und nehmen wie bei den aktiven Knöllchen während der Entwicklung anteilsmäßig von den Werten des Mn^{2+}-abhängigen Tests zu (vom 15. bis etwa zum 50. Tag von 6 % bis 24 - 37 %).

3.8. Vergleich der Stabilität der Enzyme aus Bakteroiden und pflanzlichem Cytoplasma

In Tab. 5 wird die Stabilität der Enzyme im Rohextrakt bei 0 - 4°C dargestellt. Es fällt auf, daß die pflanzliche GDH, die bakterielle GS und besonders die pflanzliche GOGAT instabiler als die übrigen Enzyme sind, die nach 24 h Aufbewahrung bei 0 - 4° C mindestens noch 86 % ihrer Ausgangsaktivität zeigen. Die pflanzliche GOGAT ist schon nach 10 h nicht mehr meßbar. Die Aktivitäten nach 24 h bei 0 - 4° C können jedoch je nach Knöllchenalter und Aufschluß um maximal ± 15 % schwanken.

Tab. 5: Stabilität der Enzyme im Rohextrakt bei 0 - 4° C (% der Ausgangsaktivität nach 24 h).

Enzym	Fraktion	Aktivität nach 24 h bei 0-4°C (%)
3-HBDH	Bakteroiden	100
AST	Bakteroiden	86
	pflanzl. Cytopl.	96
ALT	Bakteroiden	89
	pflanzl. Cytopl.	87
GDH	Bakteroiden	98
	pflanzl. Cytopl.	66
ADH	Bakteroiden	100
GS (+Mn^{2+}, Transferase-Test)	Bakteroiden	65
	pflanzl. Cytopl.	98
GOGAT	Bakteroiden	100
	pflanzl. Cytopl.	0 (2 h: 99 4 h: 85 6 h: 65 8 h: 35 10 h: 0)

3.9. Enzymaktivitäten im nichtinfizierten Wurzelgewebe

In Tab. 6 werden Enzymaktivitäten von Wurzeln, die von Kontrollpflanzen (gelagert bei -80° C) stammen, mit denen von abgeernteten infizierten Pflanzen (gelagert bei -80°C und frisch untersucht) miteinander verglichen. Für jeden der drei Untersuchungstypen wurde eine Wiederholung durchgeführt. Als Material dienten Wurzeln von Glycine max var. Mandarin (falls Infektion: Rhizobium japonicum 61-A-101), die von 37 Tage alten Pflanzen (entspricht 23. Tag nach der Infektion) stammten.

GOGAT-Aktivitäten konnten nicht, ALT-Aktivitäten nur in frischen Wurzeln bestimmt werden. Die GS-Aktivitäten waren in frisch untersuchten Wurzeln etwa doppelt so hoch wie in bei -80° C gelagerten.

Tab. 6: Vergleich der Enzymaktivitäten von nichtinfiziertem Wurzelgewebe. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Enzym	Kontrollpflanzen (Lagerung: -80°C)	Infizierte Pflanzen (Kn. abgesammelt. Lagerung. -80°C)	Infizierte Pflanzen (Kn. abgesammelt, frisch untersucht)
GDH	103,74 ∓ 26,25	85,92 ∓ 5,46	90,33 ∓ 12,57
GOGAT	0	0	0
AST	365,23 ∓ 28,28	414,76 ∓ 54,31	374,18 ∓ 13,83
ALT	0	0	198,76 ∓ 6,09
GS ($+Mn^{2+}$)	1451,94 ∓ 49,10	1572,23 ∓ 160,56	2918,71 ∓ 175,23
Proteingehalt (mg x g Frischgewicht^{-1})	1,15 ∓ 0,12	1,19 ∓ 0,04	1,07 ∓ 0,11

Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten der GDH, AST und ALT mit denen derselben Enzyme aus pflanzlichem Cytoplasma effektiver Knöllchen (Abb. 34, 30 und 32) ergibt, daß diese Werte den Daten aus senescenten Knöllchen ähnlich sind. Die GS-Aktivitäten (Mn^{2+}-abhängiger Transferase-Test) entsprechen den Werten aus sehr jungen Knöllchen. Der Gehalt an löslichem Protein ist mit weniger als 1,2 mg x g Frischgewicht^{-1} wesentlich geringer als der des Knöllchen-Cytoplasmas (Abb. 19).

3.10. Leghämoglobingehalt und Enzymaktivitäten in nach Größe fraktionierten Knöllchen während der Entwicklung

In den vorangegangenen Versuchen wurden pro Erntetag immer alle Knöllchen eingesetzt. Sie stellten die Summe verschieden großer Knöllchen dar (Abb. 11). In diesem Kapitel soll nun der Frage nachgegangen werden, welche Alterungsprozesse den Knöllchen gleicher Größe zugrunde liegen. Dazu wurde die gesamte Knöllchenpopulation eines Erntetages in vier Größenklassen unterteilt: 1) < 1800 µm, 2) 2200 - 2600 µm, 3) 3000 - 3600 µm, 4) > 4000 µm. Die Knöllchen zwischen diesen Größenklassen wurden verworfen. Als Untersuchungsmaterial dienten effektive Knöllchen von Glycine max var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101.

In Abb. 47 ist die Entwicklung des Leghämoglobingehalts pro g Knöllchen-Frischgewicht für jede der vier Größenklassen dargestellt. Jede Kurve ist geprägt durch ein Maximum ähnlich dem in Abb. 28. Dies bedeutet, daß die Größenklassen parallele Entwicklungen durchmachen. Andererseits wird deutlich, daß pro gleicher Gewichtseinheit ein um so größerer Leghämoglobingehalt meßbar ist, je größer die Knöllchen werden. Der Leghämoglobingehalt ist also einerseits vom Knöllchenalter und andererseits von der Knöllchengröße abhängig.

Betrachtet man die spezifischen Aktivitäten der pflanzlichen Enzyme AST (Abb. 48), ALT (Abb. 49) und GDH (Abb. 50) in den Größenklassen während der Knöllchenentwicklung, so erweist sich, daß in

jeder Klasse wiederum dieselbe generelle Entwicklung durchlaufen wird, wie es für die Gesamtpopulationen der Knöllchen nachgewiesen wurde (Abb. 30, 32 und 34). Die Unterschiede zwischen den Größenklassen sind allerdings gering. Bei der AST und der ALT liegen die Aktivitäten der kleinsten Klasse immerhin während der gesamten Entwicklung am höchsten. Die frühen Aktivitätsmaxima mit kurzem Anstieg sind nicht so ausgeprägt wie in den Abb. 30, 32 und 34, was dadurch erklärbar ist, daß die Messungen erst am 17. Tag beginnen. Die GOGAT-Aktivitäten kommen sowohl in den Fraktionen (Abb. 51) als auch in der Gesamtpopulation (Abb. 40) nicht über 20 mUnits hinaus. Die GS-Aktivitäten steigen während der Entwicklung wie in Abb. 42 in den Größenklassen an (Abb. 52). Im Gegensatz zu den AST- (Abb. 48) und ALT-Aktivitäten (Abb. 49) liegen hier die GS-Aktivitäten in der kleinsten Größenklasse anfänglich am niedrigsten.

Ein Vergleich der Enzymaktivitäten der AST (Abb. 53), ALT (Abb. 54) und GDH (Abb. 55) in den Bakteroiden-Fraktionen der verschiedenen Größenklassen ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Klassen. Die absoluten Werte der spezifischen Aktivitäten entsprechen etwa jenen, der in den Abb. 30, 32 und 34 (Sorte Mandarin) angegebenen, und die Entwicklungstendenzen zu etwas niedrigeren Werten hin sind ähnlich. Für die beiden Enzyme GS und GOGAT konnten in den Bakteroiden ebenfalls keine signifikante Abhängigkeit der Höhe der spezifischen Aktivität von der Knöllchengröße festgestellt werden. Die ADH-Aktivitäten (Abb. 56) hingegen ließen die Tendenz erkennen, daß in größeren und älteren Knöllchen höhere Werte vorhanden sind.

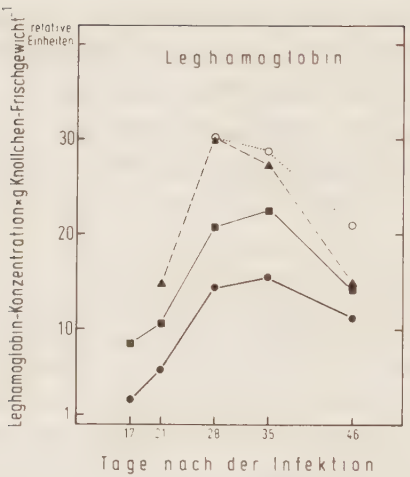


Abb. 47: Leghämoglobingehalt (relative Einheiten: s. 2.8.) pro g Knöllchen-Frischgewicht während der Entwicklung von Glycine max var. Mandarin (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101). Die Knöllchen wurden in Größenklassen unterteilt.

●——● < 1800 µm Knöllchen-Durchmesser
■——■ 2200 - 2600 µm "
▲----▲ 3000 - 3600 µm "
○·····○ >4000 µm "

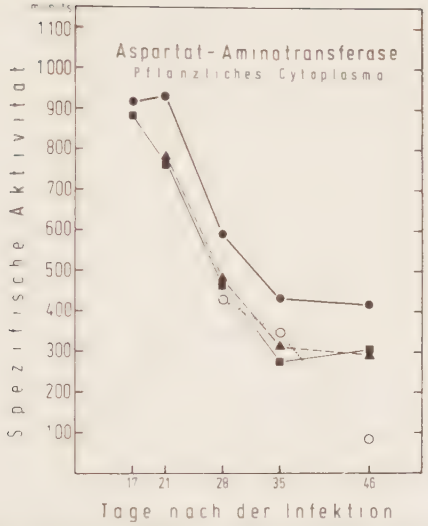


Abb. 48: Spezifische Aktivitäten (nmol Substrat x mg Protein^{-1} x min^{-1}) der Aspartat-Aminotransferase im pflanzlichen Cytoplasma während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101. Die Knöllchen wurden in Größenklassen unterteilt. Zeichen wie in Abb. 47.

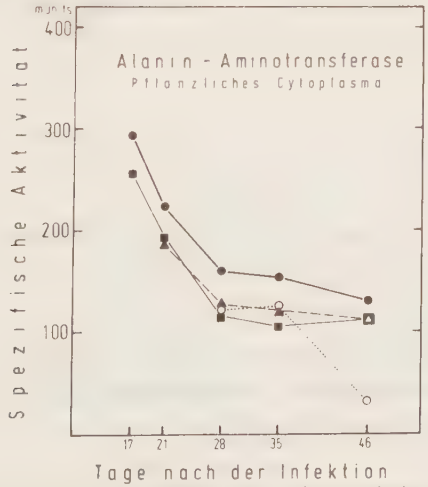


Abb. 49: Spezifische Aktivitäten der Alanin-Aminotransferase im pflanzlichen Cytoplasma von nach Größenklassen unterteilten Knöllchen. Zeichen wie in Abb. 47.

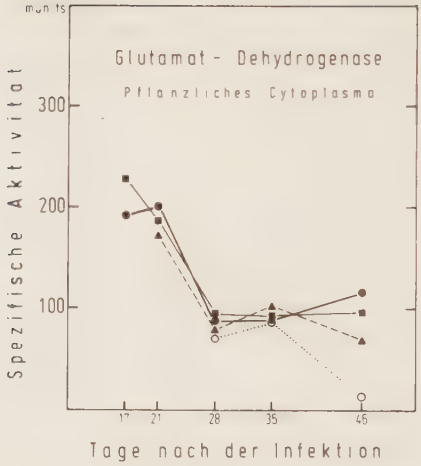


Abb. 50: Spezifische Aktivitäten der Glutamat-Dehydrogenase im pflanzlichen Cytoplasma von nach Größenklassen unterteilten Knöllchen. Zeichen wie in Abb. 47.

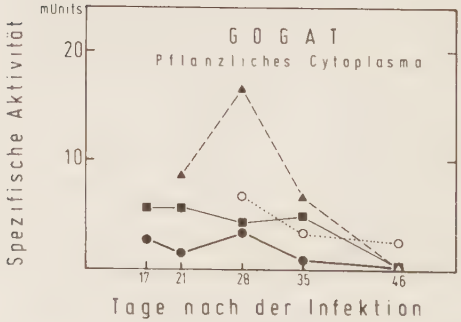


Abb. 51: Spezifische Aktivitäten der Glutamat-Synthase im pflanzlichen Cytoplasma von nach Größenklassen unterteilten Knöllchen. Zeichen wie in Abb. 47.

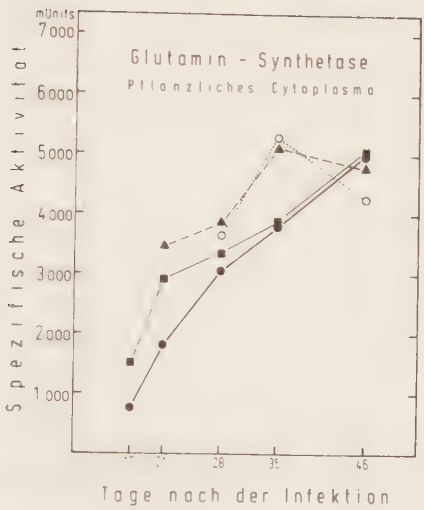


Abb. 52: Spezifische Aktivitäten der Glutamin-Synthetase im pflanzlichen Cytoplasma von nach Größenklassen unterteilten Knöllchen. Zeichen wie in Abb. 47.

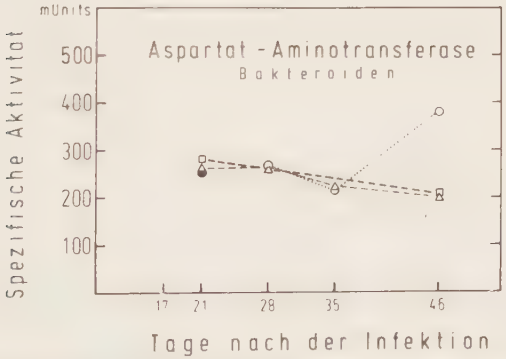


Abb. 53: Spezifische Aktivitäten der Aspartat-Aminotransferase in Bakteroiden während der Knöllchenentwicklung von Glycine max var. Mandarin, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101. Die Knöllchen wurden in Größenklassen unterteilt.

● < 1800 µm Knöllchen-Durchmesser
□----□ 2200 - 2600 µm "
△----△ 3000 - 3600 µm "
○·····○ > 4000 µm "

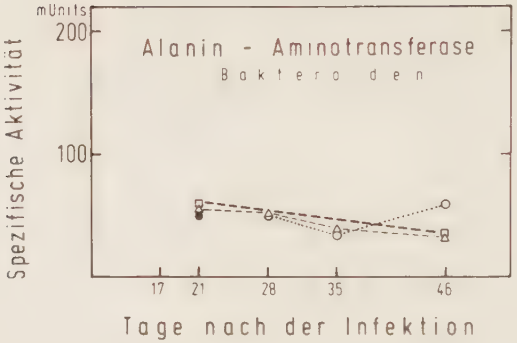


Abb. 54: Spezifische Aktivitäten der Alanin-Aminotransferase in Bakteroiden von nach Größenklassen unterteilten Knöllchen. Zeichen wie in Abb. 53.

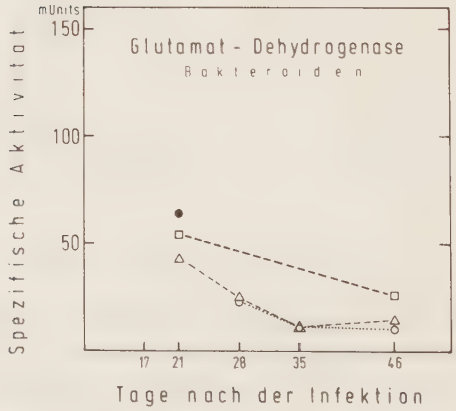


Abb. 55: Spezifische Aktivitäten der Glutamat-Dehydrogenase in Bakteroiden von nach Größenklassen unterteilten Knöllchen. Zeichen wie in Abb. 53.

Abb. 56: Spezifische Aktivitäten der Alanin-Dehydrogenase in Bakteroiden von nach Größenklassen unterteilten Knöllchen. Zeichen wie in Abb. 53.

3.11. Enzymatischer Vergleich von Nitrogenase-reprimierten und Nitrogenase-dereprimierten freilebenden Rhizobien

Nach dem Transfer in das definierte Medium 20P unter 2 % Sauerstoff (+ 10 % CO_2, 88 % N_2) entwickeln freilebende Zellen von Rhizobium japonicum innerhalb 5 bis 8 Tagen ein Nitrogenase-Aktivitätsmaximum von 180 nmol $C_2H_4 \times h^{-1} \times$ mg Bakterien-Protein^{-1}. Dies ist etwa 30 % der Aktivität, die in intakten Knöllchen (prc Bakteroiden-Protein) feststellbar ist (WERNER and STRIPF, 1978). Der in Tab. 7 angegebene Wert von 130 nmol $C_2H_4 \times h^{-1} \times$ mg Protein^{-1} der dereprimierten Zellen bezieht sich auf eine Messung in der Nähe des Aktivitätsmaximums. Die Freilebenden Zellen der Nitrogenase-aktiven Rhizobien sollen nun mit Nitrogenase-reprimierten (in Medium 20E gewachsenen; s. 2.1.) freilebenden Rhizobien und Bakteroiden verglichen werden, die aus Knöllchen von Glycine max var. Caloria, infiziert mit demselben Stamm (Rhizobium japonicum 61-A-101) isoliert wurden. Die Vergleichsgrundlage stellen die spezifischen Aktivitäten einiger Enzyme des N-Stoffwechsels dar (Tab. 7).

Die spezifische Aktivität der ADH in den Nitrogenase-aktiven freilebenden Zellen ist etwa 4 mal höher, verglichen mit den reprimierten Zellen, ist aber vergleichbar mit der in Bakteroiden gefundenen Aktivität. Diese Bakteroiden wurden aus Knöllchen mit maximaler Nitrogenase-Aktivität (22 Tage nach der Infektion) isoliert. Die Aktivität der AST ist in Nitrogenase-aktiven Zellen mit 400 nmol Substrat x mg Protein^{-1} x min^{-1} etwa zweimal höher als in nichtaktiven Rhizobien und ebenfalls sehr nahe dem in Bakteroiden gefundenen Wert. Ein drittes Enzym mit einer ähnlichen Aktivität in Nitrogenase-aktiven, freilebenden Zellen und in Bakteroiden und einer signifikant reduzierten Aktivität in reprimierten Zellen ist die Glutamat-Synthase (GOGAT). Aber die gefundenen spezifischen Aktivitäten in allen drei Zell-Typen sind viel kleiner als jene der ersten beiden beschriebenen Enzyme. Für die anderen drei Enzyme in Tab. 7 wurde diese Korrelation nicht nachgewiesen. Die 3-HBDH

hat die niedrigste Aktivität in Bakteroiden 22 Tage nach der Infektion, eine mittlere Aktivität in den Nitrogenase-reprimierten Rhizobien und die höchste in Nitrogenase-aktiven Zellen. Die spezifische Aktivität dieses Enzyms in Bakteroiden steigt allerdings zwischen 3 und 4 Wochen nach der Infektion noch weiter an. Die ALT erreicht nur 15 bis 20 % der spezifischen Aktivität der AST in allen drei Zelltypen. Der kleine Unterschied zwischen Nitrogenase-reprimierten und -dereprimierten Zellen ist nicht signifikant. Die GS hat auch etwa dieselbe spezifische Aktivität in den dereprimierten Zellen und in den Bakteroiden, aber sie ist in den Nitrogenase-inaktiven Rhizobien 3 - 4 mal aktiver. Es wurde keine GDH-Aktivität in den freilebenden Zellen gefunden, aber auch nur 29 mUnits in der Bakteroiden-Fraktion.

3.12. Ultrastrukturelle Differenzierung der Knöllchen von *Glycine max*

3.12.1. Effektive Knöllchen

Um die ultrastrukturelle Entwicklung der Wurzelknöllchen nachzuvollziehen, wurden Knöllchen einer typischen mittleren Größe eines Erntestadiums im frischen Zustand verwendet. Die effektiven Knöllchen stammten von *Glycine max* var. Caloria, infiziert mit *Rhizobium japonicum* 3I1b85.

Die Rhizobien werden durch die von ihnen produzierten extrazellulären Polysaccharide in der Kapsel (wahrscheinlich nicht über die äußere Bakterienmembran und die Flagellen) an die Proteine (Lectine) der Wurzelhaaroberfläche gebunden (HUBELL, 1970; CALVERT *et al.*, 1978; TSIEN and SCHMIDT, 1977) und verursachen als ersten sichtbaren Effekt durch Exkretion von Indolessigsäure eine Verlängerung und Deformierung der Wurzelhaare (DIXON, 1969). Der Eintritt in die Wurzelhaare schließt ein Aufweichen und einen Abbau von Zellwandsubstanzen ein. Es ist nicht genau bekannt wie *Rhizobium* die Ausbildung

Tab. 7: Spezifische Aktivitäten (nmol Substrat x mg Protein^{-1} x min^{-1}) einiger Enzyme des N-Stoffwechsels von Nitrogenase-reprimierten und -dereprimierten freilebenden Zellen von Rhizobium japonicum 61-A-101 und von Bakteroiden von Glycine max var. Caloria, infiziert mit demselben Stamm. Die Abweichungen in wiederholten Experimenten betrug ca. 10 % oder weniger der angegebenen Daten.

Enzym	R. japonicum, Flussigkeitskultur, dereprimierte Nitrogenase	R. japonicum, Flussigkeitskultur, reprimierte Nitrogenase	Bakteroiden 22 Tage nach der Infektion
	m-Units		
Alanin-Dehydrogenase	319	75	245
Aspartat-Aminotransferase	400	220	442
Glutamat-Synthase	42	20	41
3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase	358	239	159
Alanin-Aminotransferase	59	51	76
Glutamin-Synthetase (+Mn^{2+})	477	1595	390
Glutamat-Dehydrogenase	0	0	29
Nitrogenase-Aktivität	130[a]	0	14 - 18[b]

[a] nmol C_2H_4 x mg Protein^{-1} x h^{-1}

[b] nmol C_2H_4 x mg Knöllchen-Frischgewicht^{-1} x h^{-1}

des Infektionsfadens iniziiert, der aus einer Wand besteht, die ähnlich jener der Wurzelhaarspitze ist (DART, 1977). Der Infektionsfaden wächst durch das Wurzelhaar und die corticalen Zellen, die durch Kinetin und Auxin der Rhizobien (die durch den wachsenden Infektionsfaden wandern und sich dort schon teilen) zur Teilung stimuliert werden. Der Infektionsfaden ist eingeschlossen von dem Plasmalemma der infizierten Zelle. GOODCHILD and BERGERSEN (1966) fanden, daß die Bakterien (Rhizobium japonicum) durch "zellulose-freie" laterale Ausbuchtungen des Infektionsfadens freigesetzt werden. Die Bakterien treten durch einen "endocytotischen Prozeß" aus und bleiben in einer Infektionsvakuole eingeschlossen, die nur noch von jener Membran abgegrenzt ist, die sich von der Wirtszelle ableiten läßt. BASSETT et al. (1977) gaben als Alternative für das Freisetzen der Rhizobien aus dem Infektionsfaden an, daß die Fadenwand aufgelöst wird und anschließend in membrangebundenen Vesikeln, die sich von der den Faden umgebenden Membran ableiten läßt, kompartimentiert wird. Die Endocytose des Fadenmaterials befreit die Bakterien von der Infektionsfaden-Wand aber läßt sie weiter von der Faden-Membran umhüllt. Die Bakterien werden dann individuell in das Wirtscytoplasma freigesetzt, indem sie sich durch Abschnürung der Faden-Membran in einem weiteren endocytotischen Prozeß vom Haupt-Infektionsfaden trennen.

In den Infektionsvakuolen differenzieren sich die Bakterien zu vergrößerten und deformierten Bakteroiden. In frühen Stadien teilen sich die Infektionsvakuolen und Bakterien synchron, später werden Teilungen der Bakteroiden ohne gleichzeitige Teilungen der Vakuolen beobachtet, so daß mehrere Bakteroiden in einer Vakuole liegen (GOODCHILD and BERGERSEN, 1966).

Die Differenzierung der Bakterien in sich nicht mehr teilende, NH_4^+-produzierende Bakteroiden schließt eine große Zahl von biochemischen Veränderungen ein, wie z.B.: Leghämoglobin wird synthetisiert; die Cytochrome verändern sich: Verringerung von Cyt a,

a_3, Zunahme von Cyt c, P 420, P 450; der DNA-Gehalt pro Zelle steigt an; die Permeabilität der Bakterienzellwand verändert sich; Reservestoffe werden akkumuliert (Poly-ß-Hydroxybuttersäure, Glycogen und Polyphosphate); die Bakteroiden verlieren die Lebensfähigkeit als freilebende Zellen; 2-Oxoglutarat und L-Glutamat werden vermindert aufgenommen; die Nitrogenase-Synthese wird dereprimiert; die serologischen Eigenschaften sind verschieden; die Aktivitäten der respiratorischen Enzyme und nicht zuletzt die Aktivitäten der Enzyme des N-Stoffwechsels verändern sich (EVANS and RUSSEL, 1971; DIXON, 1969; BERGERSEN, 1971, 1974; WERNER, 1974; VAN BRUSSEL, 1973; GOODCHILD and BERGERSEN, 1966). Ein Teil der Bakteroiden-enthaltenden (bis mehrere Tausend pro Zelle) Zellen eines Knöllchens hat ein kürzeres Leben als das gesamte Knöllchen. Der Zerfall der Zellen, der sich durch grüne Abbaustoffe des Leghämoglobins bemerkbar macht, beginnt im Soja-Knöllchen im Zentrum, einige Wochen bevor die Funktionsfähigkeit des Knöllchens erschöpft ist. Die Degeneration beginnt gewöhnlich mit dem Zerfall der Feinstruktur des Wirt-Cytoplasmas, gefolgt von einer mehr oder weniger vollständigen Auflösung der Bakteroiden (BERGERSEN, 1974).

Im folgenden soll die ultrastrukturelle Entwicklung von Wurzelknöllchen der bereits enzymatisch untersuchten Soja-Sorte Caloria anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen dargestellt werden.

11 Tage alte Knöllchen (Abb. I und II), in denen noch keine Nitrogenase-Aktivität gefunden wird, zeigen pro Pflanzenzellen-Querschnitt in der Regel weniger als 10 einzelne Bakterien, die eine auffällig zentrale Lage innerhalb der Infektionsvakuole einnehmen. In Abb. II ist ein hervorstehender Teil der Membranhülle an einer Seite sichtbar; dies zeigt möglicherweise ein Wachsen der Membran während der Teilung der Bakterienzelle an. Infizierte und nichtinfizierte Zellen zeigen in dieser Zone eine große Zahl von Dictyosomen, rauhem Endoplasmatischen Reticulum, Ribosomen und

Plastiden (Abb. I und II). Die Dichte des pflanzlichen Cytoplasmas weist auf eine hohe Syntheseaktivität hin.

4 Tage später ist die Zahl der Bakteroiden in den infizierten Zellen erwartungsgemäß angestiegen (Abb. III und IV). Abb. III zeigt Rhizobium-Zellen innerhalb des Infektionsfadens zwischen Pflanzen-Zellwänden und deutlich rauhes endoplasmatisches Reticulum. In diesem Stadium sind enge Assoziationen von besonders großen Mitochondrien mit einigen noch Stärke enthaltenden Amyloplasten sichtbar (Abb. IV). WERNER and MÖRSCHEL (1978) weisen darauf hin, daß die innere Cristae-reiche Struktur der Mitochondrien eher denen aus Herzmuskelzellen mit hohem Energiestoffwechsel (FAWCETT, 1966) ähneln, als jenen aus meristematischen Pflanzenzellen (Abb. I).

Die durchschnittliche Zahl der Bakteroiden pro Infektionsvakuole beträgt 20 Tage nach der Infektion 1,2. Die Bakteroiden und ihre Infektionsvakuolen füllen mehr als 80 % des Pflanzenzellen-Volumens aus (Abb. V). Innerhalb weniger Tage sind die Bakteroiden pro Pflanzenzellen-Querschnitt auf über 400 Zellen angewachsen. Die Teilungsrate liegt aber noch signifikant unter jener von etwa 8 h, die mit freilebenden Zellen von Rhizobium japonicum ermittelt wurde (WERNER and BERGHÄUSER, 1976). Aber eine genaue Teilungsrate der Bakteroiden in den Pflanzenzellen kann nicht bestimmt werden, da nicht angenommen werden kann, daß die Bakteroiden in dem für sie zur Verfügung stehenden begrenzten Raum einem logarithmischen Wachstum folgen (WERNER and MÖRSCHEL, 1978).

Zu diesem Zeitpunkt müssen die infizierten Pflanzen-Zellen einen hohen Energiebedarf haben: für die Vermehrung der Bakteroiden, zur Unterstützung der hohen N_2-Fixierungsaktivität, die etwa 15 mol ATP pro mol reduziertem N_2 benötigt (POSTGATE, 1977) und für das Wachstum der Pflanzenzellen selbst (WERNER and MÖRSCHEL, 1978).

Die den Bakteroiden-enthaltenden benachbarten nichtinfizierten Zellen bleiben deutlich kleiner. Das Cytoplasma dieser Zellen mit vielen Stärkekörnern bildet meist einen dünnen Schlauch entlang

der Zellwand und steht über Plasmodesmen in enger Verbindung mit den infizierten Zellen. (Abb. V). Eine stärkere Vergrößerung der Bakteroiden zeigt die Akkumulation von elektronendurchlässiger (weißer) Poly-ß-Hydroxybuttersäure (PHBS) in der Regel an den Enden der Bakteroiden und von elektronendichten Polyphosphat-Granula in der Nähe des zentral lokalisierten Kerns (Abb. VI).

9 Tage später, am 29. Tag nach der Infektion ist die enge Verbindung der großen Mitochondrien mit Plastiden in der Nähe der Zellwände noch sichtbar, aber die Stärke ist abgebaut (Abb. VII). Die Zahl der Bakteroiden pro Infektionsvakuole hat weiterhin zugenommen.

35 Tage nach der Infektion (Abb. VIII) werden keine wesentlichen ultrastrukturelle Veränderungen der infizierten Zellen beobachtet. Innerhalb der Bakteroiden wird die PHBS auch im zentralen Teil der Zelle akkumuliert. In den Infektionsvakuolen werden nun noch mehr Bakteroiden sichtbar. Auffällig ist, daß der freie Raum innerhalb der Vakuolen mit einem Bakteroid kleiner ist als mit zwei bis vier Bakteroiden. Abbauerscheinungen der Bakteroiden oder des pflanzlichen Cytoplasmas sind noch nicht erkennbar. Die Infektionsvakuolen sind sehr nahe an dem gelappten, unregelmäßig geformten pflanzlichen Zellkern lokalisiert.

3.12.2. Ineffektive Knöllchen

Die ineffektiven Knöllchen stammten von Glycine max var. Caloria, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-24.

Abb. IX zeigt eine 15 Tage alte infizierte Zelle neben nichtinfizierten. Die Bakterien liegen in einzelnen Vakuolen, das pflanzliche Cytoplasma ist relativ dicht und besitzt wohl noch eine hohe Syntheseleistung, der Kern ist etwas gelappt und besitzt nicht die starken Verdichtungen wie die rundlichen Kerne junger effektiver Knöllchen (Abb. I). In der Nähe des Kerns ist ein Infektionsfaden sichtbar, dessen Zellwand in Auflösung begriffen ist.

In der Nähe der Stärke enthaltenden Plastiden liegen zu diesem Zeitpunkt auch Mitochondrien (Abb. X); diese besitzen aber eine nicht ganz so dichte, Cristae-reiche innere Struktur wie in effektiven Knöllchen (Abb. IV). Die Symbionten-Zellen sind in diesem Stadium in der Lage sich innerhalb der Infektionsvakuole zu teilen (Abb. XI). In der Wirtszelle ist ein Dictyosom sichtbar (Abb. XI).

Der Infektionsprozeß in effektiven und ineffektiven Knöllchen scheint also derselbe zu sein. Zu einer ähnlichen Aussage kommen auch NEWCOMB et al. (1977) anhand von Pisum sativum-Knöllchen (infiziert mit Rhizobium leguminosarum).

Einzelne Bakterien, deren Plasma in der Nähe ihrer Zellwand an Dichte verliert, können in einer vergrößerten Vakuole liegen, andere scheinen die Infektionsvakuole zu verlieren (Abb. XII).

Die Zahl der Bakterien nimmt innerhalb der infizierten Zellen noch zu. (Obwohl zweifelhaft ist, ob die Bakterien in ineffektiven Knöllchen überhaupt die Entwicklung zu Bakteroiden durchmachen, werden die Symbionten in ineffektiven Knöllchen hier auch als Bakteroiden bezeichnet). Aber die Rhizobien sind nur noch zum Teil oder überhaupt nicht mehr von einer Membranhülle umgeben. Insgesamt sind weniger Zellen innerhalb des Knöllchens infiziert als bei effektiven Knöllchen. CHEN and THORNTON (1940) geben das Verhältnis 1,91 : 1 (% infizierte Zellen pro Volumen eines Soja-Knöllchens) für effektive und ineffektive Knöllchen an. Die Seneszenz kann in vielen Zellen ineffektiver Knöllchen schon früh einsetzen. In der Regel setzt sie ein, bevor bei effektiven Knöllchen Abbauprozesse beobachtbar sind. Sie schließt ähnlich wie in Pisum sativum-Knöllchen (NEWCOMB et al., 1977) eine Degeneration des Wirt-Cytoplasmas ein, bevor die Bakterien absterben. In Abb. XIII ist ein Ausschnitt aus einer degenerierenden, nicht für den Zustand des ganzen Knöllchens repräsentative Zelle abgebildet. Das pflanzliche Cytoplasma ist reduziert und ohne Ribosomen und andere Organellen. Die Bakteroiden stellen keine durch die Vakuolen vom pflanzlichen Plasma

abgetrennte "Innenwelt" mehr dar und erscheinen nur noch im Kontakt mit Plasmarestbeständen lebensfähig und elektronendicht. Die in den elektronendurchlässigen Bereichen der Pflanzenzelle liegenden Bakteroiden verlieren selbst an plasmatischer Dichte. Nur selten findet man Akkumulationen von PHBS, während die der Polyphosphate häufiger sind. Gegenüber Bakteroiden aus effektiven Knöllchen (Abb. V) kommen in ineffektiven Knöllchen noch deformiertere Zellen zustande. Nichtinfizierte Zellen besitzen große Stärkekörner, die im Gegensatz zu effektiven Knöllchen während der Entwicklung nicht abgebaut werden. Das Plasma dieser Zellen ist stark reduziert; in diesem kann aber noch ein großer Kern liegen (Abb. XIV). In infizierten Zellen von 25 Tage alten Knöllchen kann das pflanzliche Cytoplasma noch weiter abgebaut sein, so daß das Plasma der darin liegenden Bakteroiden weiter degeneriert. Durch den Plasmaschwund der infizierten Zellen (Abb. XIV und XV) ist der osmotische Druck auf nichtinfizierte nicht vorhanden, im Vergleich zu effektiven Knöllchen (WERNER and MÖRSCHEL, 1978: Abb.7). Im Gegenteil, wie CHEN and THORNTON (1940) schon beobachteten, scheinen die infizierten Zellen zu kollabieren.

4. DISKUSSION

4.1. N_2-Fixierung und Wachstum von Knöllchen: Zusammenhänge und Einflüsse

In manchen Arbeiten, die sich mit Enzymen des Stickstoffstoffwechsels in Knöllchen beschäftigen, werden Aktivitäten von verschiedenen Pflanzen z.T. unterschiedlichen Alters miteinander verglichen (z.B. DUNN and KLUCAS, 1973; BROWN and DILWORTH, 1975). Da die spezifischen Aktivitäten der Knöllchen-Enzyme nach den vorliegenden Ergebnissen sehr vom Alter der Pflanze und von den Wachstumsbedingungen (KURZ et al., 1975) abhängen, wurden die Bestimmungen anhand der Summe der Knöllchen, die von Pflanzen eines Erntezeitpunktes stammten, durchgeführt. Die Nitrogenase-Aktivitäten der effektiven Knöllchen dienten als Orientierungswerte für alle anderen Enzymaktivitäten. Durch die gezielte Infektion der zwei Wochen vorgekeimten Soja-Pflanzen mit Rhizobien konnten definierte Entwicklungsstadien geerntet werden, die auch elektronenmikroskopisch untersucht wurden (WERNER and MÖRSCHEL, 1978). Es gibt Hinweise dafür, daß die an einem Tag gemessenen Nitrogenase-Aktivitäten die Summe von mehr oder weniger aktiven Knöllchen darstellen. Eine Abhängigkeit zwischen Knöllchengröße und der Nitrogenase-Aktivität konnten schon MAGUE and BURRIS (1972), LAWRIE and WHEELER (1975) und NASH and SCHULMAN (1976) nachweisen.

Die unterschiedlichen Nitrogenase-Aktivitäten der Soja-Sorten (Abb. 21, 23) sind wohl zum Teil auf das Genom der Pflanze zurückzuführen, da mit demselben Rhizobienstamm (61-A-101) infiziert wurde. Die Infektion derselben Sorten mit einem anderen Stamm (3I1b85) ergibt keine wesentlichen Unterschiede in den Nitrogenase-Aktivitäten (Abb. 22, 24). Dies bedeutet, daß die von uns verwendeten Rhizobienstämme sich zumindest hinsichtlich der Symbiose kaum in der Nitrogenase-Aktivität unterscheiden. Andererseits können aber andere Rhizobienstämme die Effektivität der N_2-Fixierung in Sojabohnen stark beeinflussen (SLOGER, 1969;

WEBER et al., 1971; MAGUE and BURRIS, 1972; DATE, 1976; KUYKENDALL and ELKAN, 1976). Die Interaktion der Genotypen von Rhizobium japonicum (welches das nif-Gen zur Synthese der Nitrogenase besitzt; CHILD, 1975; KEISTER, 1975; KURZ and LARUE, 1975; MCCOMB et al., 1975; PAGAN et al., 1975; SCOWCROFT and GIBSON, 1975; TJEPKEMA and EVANS, 1975; WERNER, 1976) und der Soja-Pflanze kontrolliert die N_2-Fixierung; diese Wechselwirkungen können in der Wirts-Pflanze auch durch unterschiedliches Wachstum beantwortet werden (MARTINEZ et al., 1970; BALASUNDARAM and SEN, 1977). Die Wechselbeziehungen zwischen der Wirtspflanze und den Stämmen einer Rhizobienart betreffen also u.a. die Knöllchenbildung und die N_2-Fixierung. Daraus resultiert eine Reihe genetischer Variationsmöglichkeiten zwischen den beiden Systemen. Die eine mögliche Wirt-Bakterien-Interaktion ist das Ausbleiben der Knöllchenbildung bei Pflanzen, die mit Bakterien von kompatiblen Arten in Kontakt gebracht wurden. Bei der Ausbildung von Knöllchen werden ineffektive und effektive unterschieden. Ineffektive Knöllchenbildung umfaßt den Infektionsprozeß und die Ausbildung der Knöllchenbildung, aber vollständig normale große Knöllchen mit Nitrogenase-Aktivität werden nicht ausgebildet. Effektive Knöllchenbildung führt zu großen Knöllchen, die im Falle ausbleibender N_2-Fixierungsaktivität als ineffizient bezeichnet werden; sind sie dagegen Nitrogenase-aktiv, so gehören sie zu dem effizienten Typus (CALDWELL and VEST, 1977; SCHWINGHAMER, 1977). Die hier verwendeten Stämme von Rhizobium japonicum 61-A-101 und 3I1b85 sind effektiv und effizient; der Stamm 61-A-24 ist ineffektiv nach den vorliegenden Ergebnissen und nach Angabe von Dr. Burton (Nitragin Company, Milwaukee, Wisconsin; persönliche Mitteilung, 1977) bei bisher allen untersuchten Sorten von Glycine max. MAGUE and BURRIS (1972) fanden dennoch in Freilandexperimenten Nitrogenase-Aktivität (halb so hoch wie bei einem effektiven Stamm) bei der Sorte Hark von Glycine max nach Infektion mit demselben ineffektiven Stamm (61-A-24). Möglicherweise hängt diese effektive Knöllchenbildung auch mit der Toleranz gegenüber einigen Faktoren des Bodens zusammen (SCHWINGHAMER, 1977) oder es fanden Fremdinfektionen statt.

Die spezifischen- und die Gesamt-Nitrogenase-Aktivitäten, die sich auf 1 g Knöllchen-Frischgewicht bzw. auf alle Knöllchen einer Pflanze beziehen, fallen bei unseren Wachstumsbedingungen in Klimakammern nach Beendigung der Blüte und mit Beginn der Samenbildung deutlich ab (Abb. 21-26). Ähnliches wird von im Gewächshaus angezogenen Pisum sativum-Pflanzen berichtet (LARUE and KURZ, 1973). LAWRIE and WHEELER (1974) fanden bei einer anderen in Klimakammern wachsenden Sorte von Pisum sativum und LAWN and BRUN (1974) bei einer unter Freilandbedingungen angezogenen Soja-Sorte (Clay) bereits während der Blüte einen Abfall der spezifischen und Gesamt-Nitrogenase-Aktivität. Die Sorte Chippewa 64 von Glycine max zeigte jedoch im Freiland erst in der frühen Phase der Samenbildung einen gleichzeitigen Abfall der spezifischen und der Gesamt-Aktivität (LAWN and BRUN, 1974). TRINICK et al. (1976) zeigten bei im Freiland kultivierten Lupinen eine deutliche Verschiebung der Maxima der Gesamt-Aktivität um einige Wochen zu den älteren Pflanzen hin, im Vergleich zu den Maxima der spezifischen Nitrogenase-Aktivität. HARDY et al. (1968, 1971), WEBER et al. (1971) und MAGUE and BURRIS (1972) fanden in Feldexperimenten bei Soja-Pflanzen eine starke Zunahme der Gesamt-Aktivität während der Fruchtbildung und Reife. MAGUE and BURRIS (1972) konnten zudem nachweisen, daß die N_2-Fixierung mit der relativen Reifungszeit verschiedener Soja-Sorten zusammenhängt. Die Gründe für diese Variationen der Zusammenhänge von Blüte und Fruchtbildung mit der N_2-Fixierung, sowohl zwischen den Sorten und innerhalb derselben Sorte, sind von genotypischen und von äußeren (die Wachstumsbedingungen betreffenden) Faktoren abhängig.

In der vorliegenden Arbeit wurden 14 Tage vorgekeimte Pflanzen mit Rhizobien infiziert, im Gegensatz zu der sonst üblichen Samen-Inokulation. Zum Zeitpunkt der Infektion liegt also bereits ein teilweise ausgebildetes Wurzelsystem von Haupt- und Nebenwurzeln vor. Die unterschiedlichen Infektionsmodi könnten einen Einfluß auf die Aktivitätsprofile während der Entwicklung der Soja-Pflanzen haben, da der In-

fektions- und Aktivitätsverlauf von der Wurzelentwicklung abhängig ist. SLOGER et al. (1975) konnten nämlich bei Glycine max anhand von Feldexperimenten nachweisen, daß die Knöllchenbildung zuerst an der Hauptwurzel erfolgt. Während der vegetativen Wachstumsperiode stellen diese Knöllchen den größten Anteil an der symbiontischen N_2-Fixierung der Pflanze. Nach der Blüte jedoch fällt ihr Anteil an der Gesamtaktivität ab, bedingt durch Senescenz und Ausbleiben weiterer Infektionen an der Hauptwurzel. Die Knöllchenbildung an den Seitenwurzeln führt zu einem zunehmenden Anteil der Aktivität pro Pflanze während der Entwicklung und übertrifft nach der Blüte jenen der Hauptwurzel-Knöllchen. Neben Faktoren, wie Wasser- und Nährstoff-Gehalt des Bodens (z.B. NO_3^- und NH_4^+ führen zu verminderter N_2-Fixierung), Temperatur, Rhizobien-Stamm und Soja-Sorte können sich auch Faktoren, welche die Verfügbarkeit von Photosynthese-Verbindungen beeinflussen auf die N_2-Fixierung auswirken. Zu diesen Faktoren gehören die Lichtintensität, die Größe des Blattwerks, die Transportfähigkeit von Photosynthese-Produkten und der CO_2- und O_2-Partialdruck (HARDY and HAVELKA, 1976; PATE, 1976). Ein weiterer wichtiger Faktor stellt die Konkurrenz kompetitiver Attraktionszentren (Sinks) um die Assimilate dar. LAWN and BRUN (1974) korrelierten den Abfall der Aktivität in Soja-Knöllchen mit der Bildung der Früchte, die als neue "Sinks" mit den Knöllchen um die Assimilate konkurrieren. Aufgrund der in nicht mehr optimalen Mengen zur Verfügung stehenden Assimilate ist die N_2-Fixierung limitiert. Die Verbesserung der genotypischen Faktoren (durch geeignete Wahl von Soja-Sorten und Rhizobien-Stämmen) und der Außen-Faktoren (z.B. höhere Lichtintensität), die das Assimilate/Sink-Verhältnis vergrößern führen somit zu einem verringerten Abfall der Nitrogenase-Aktivität.

Diurnale Schwankungen der Nitrogenase-Aktivität bei Soja-Pflanzen, die unter Freiland- bzw. Gewächshaus-Bedingungen aufwuchsen, wurden von HARDY et al. (1968), BERGERSEN (1970), MAGUE and BURRIS (1972) und SLOGER et al. (1975) beschrieben; das Aktivitätsmaximum folgte

häufig kurz nach dem Maximum der Lichtintensität in der Mitte des Tages. LAWRIE and WHEELER (1973) vermuteten, daß die verfügbaren Kohlenhydrate der maßgebende Faktor für die Schwankungen in Pisum sativum-Knöllchen darstellen. Das Ausbleiben eines diurnalen Rhythmus in Freiland-Lupinen erhärtet diese Hypothese, da diese Kohlenhydrat-Reserven besitzen (TRINICK et al., 1976). Pisum sativum-Pflanzen zeigten in Klimakammern (unter verschiedenen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen in der Licht- und Dunkelphase) innerhalb von 3 h eine zunehmende Fixierungsrate pro Pflanze bis zu einem Maximum; diese blieb bis zu etwa 3 h in der Dunkelphase konstant, fiel dann aber leicht auf ein Minimum zu Beginn der nächsten Photoperiode ab. Dieser Befund könnte die relativ gleichen Aktivitäten der in der vorliegenden Arbeit 4 h und 8 1/2 h nach Beginn der Lichtphase getesteten Soja-Pflanzen erklären (s. 3.5.2.). Um trotzdem eventuelle Schwankungen zu vermeiden, wurden die Pflanzen immer 4 h nach Beginn der Lichtphase gemessen.

Die Auswirkungen vorhandener und fehlender N_2-Fixierung in der Symbiose von Glycine max, infiziert mit einem effektiven (61-A-101) und ineffektiven (61-A-24) Stamm von Rhizobium japonicum auf das Knöllchenwachstum werden in Abb. 7 und Abb. 8 dargestellt. Das Gewicht effektiver Knöllchen nimmt vom 15. bis zum 40. Tag um etwa das Sechsfache zu, während die Knöllchenzahl pro Pflanze nach dem 15. Tag konstant bleibt (Abb. 7, 11). Im Gegensatz hierzu produzieren ineffektive Pflanzen mindestens bis zum 50. Tag ständig neue Knöllchen, die allerdings wesentlich kleiner bleiben (Abb. 8, 12); außerdem reagieren die Sorten Caloria und Mandarin in der Ausbildung neuer Knöllchen unterschiedlich. Der sortenspezifische Unterschied bezüglich der Knöllchenzahl und -größe bei den ineffektiven Symbiosen (Abb. 8) kompensiert sich jedoch, wenn das Gesamtknöllchengewicht pro 10 Pflanzen gebildet wird (Abb. 9). Aber auch innerhalb einer Sorte kann eine Pflanze nur bis zu einem konstanten Betrag Knöllchengewebe produzieren (Abb. 10). Dies ist ein Hinweis dafür, daß die Pflanze nur eine begrenzte Produktionskapazität von Knöllchengewebe hat. Die

Bildung eines bestimmten Betrags von Organgewebe, bestimmbar aus der Knöllchengröße und der Häufigkeit, kann je nach Sorte unterschiedlich sein (NUTMAN, 1959); er kann aber auch vom Rhizobienstamm abhängig sein. Die Infektion mit einem ineffektiven im Gegensatz zu einem effektiven Stamm zeigt auch einen sortenspezifischen Unterschied bezüglich des Wachstumsverlaufs der Knöllchen. Die etwas höheren Kapazitäten der effektiven Symbiose können auch mit der verbesserten Wachstumsleistung bei vorhandener N_2-Fixierung erklärt werden.

Ein Zusammenhang zwischen der ständigen Neubildung von Knöllchen und fehlender N_2-Fixierung liegt nahe. Möglicherweise wirken sich die erhöhten Konzentrationen von z.B. NH_4^+ oder von Assimilationsprodukten wie Glutamat und Asparagin hemmend auf die vom Rindengewebe ausgehenden Knöllchenneubildungen aus. So könnte eine langsame und gestoppte Infektionsrate durch eine starke Hemmwirkung der ersten schnellwachsenden effektiven Knöllchen erklärt werden, während eine hohe Rate aufgrund der schwachen oder ausbleibenden Hemmung durch langsamwachsende (ineffektive) Knöllchen zustande käme. Ein Vergleich der Größenverteilungsdiagramme während der Wachstumsperiode effektiver Knöllchen macht deutlich, daß bis zum Zeitpunkt maximaler Nitrogenase-Aktivität nur Knöllchen unter 3600 µm gebildet sind, d.h. Größen darüber führen zu keiner weiteren Aktivitätserhöhung. Da vor dem Nitrogenase-Aktivitätsmaximum hauptsächlich kleine Knöllchen (unter 1600 µm) gefunden werden, liegen die Größen mit maximaler Aktivität zwischen 1600 µm und 3600 µm (Abb. 11). Der Hauptanteil der ineffektiven Knöllchen bleibt während der Entwicklung jedoch in der kleinsten Siebfraktion (Abb. 12); die größeren Siebstufen werden nicht mehr erreicht (bei der Sorte Caloria bis zu 2800 µm; bei der Sorte Mandarin bis zu 3300 µm).

Der Wassergehalt des Bodens ist ein weiterer wichtiger Faktor, der die Zahl und Größe, die Atmungsaktivität und die N_2-Fixierung der Knöllchen und das oberirdische Wachstum beeinflußt (SPRENT, 1971a,b, 1976; SEPASKHAH, 1977; BUNCE, 1978). Sowohl Wasserübersättigung

(verringerte Atmungsfähigkeit; SPRENT, 1976) als auch Wassermangel, bei dem die Gasdiffusion in die Knöllchen durch kollabierte Lenticellen vermindert ist (PANKHURST and SPRENT, 1975a,b), beeinflussen das Wachstum. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Perlite-Böden sind hinsichtlich des Knöllchen- und oberirdischen Wachstums getestet worden (Tab. 4; Abb. 13,14). Sowohl unter "normalen" als auch unter Wasser-Mangel-Bedingungen war die Sorte mit der feinsten Körnung aufgrund der höchsten Wasseraufnahmekapazität und noch guter Durchlüftungsfähigkeit die günstigste. Das allgemein verwendete Agriperl-Pflanzenperlite lieferte trotz unspezifischerer Körnung ebenfalls hohe Wert.

Nachdem bisher die Auswirkungen verschiedener Rhizobien-Stämme und Soja-Sorten und bestimmter Außenfaktoren, wie z.B. die Lichtintensität und der Wassergehalt des Bodens auf den Wachstums- und Nitrogenase-Aktivitäts-Verlauf diskutiert wurden, soll nun näher auf den Einfluß der O_2-Konzentration als weiterer Faktor, der die N_2-Fixierung (Abb. 27) der Knöllchen beeinflußt, eingegangen werden. Der O_2-Partialdruck ist, wie später noch diskutiert wird, auch ein entscheidender Faktor für die Nitrogenase-Induktion bei freilebenden Rhizobien.

Soja-Pflanzen, die unter verschiedenen O_2- und CO_2-Konzentrationen in der Atmosphäre aufwachsen entwickeln sich unterschiedlich. Die Gesamtaktivität der N_2-Fixierung und das Gesamtwachstum der Pflanze steigen mit CO_2 zu O_2-Verhältnissen an, die größer als das Verhältnis in der Luft sind und fallen umgekehrt mit kleineren Verhältnissen ab. Die Zunahme der Gesamtaktivität der N_2-Fixierung und des Gesamtwachstums bei Verringerung des O_2- und Erhöhung des CO_2-Anteils der Atmosphäre ist einerseits auf die Stimulation der photosynthetischen Netto-CO_2-Fixierung und andererseits auf die Verminderung der Photorespiration zurückzuführen (QUEBEDEAUX and HARDY, 1975; QUEBEDEAUX et al., 1975). Die Abnahme der N_2-Fixierung bei erhöhtem O_2/CO_2-Verhältnis wird durch eine verringerte Netto-CO_2-Fixierung und eine vermehrte Photorespiration

erklärt. Diese Ergebnisse unterstützen ebenfalls die Hypothese, daß die den Knöllchen zur Verfügung stehenden Assimilate einen primären Faktor, welcher die N_2-Fixierung limitiert, darstellen.

Die innerhalb kurzer Zeit (1 h) durchführbare Acetylen-Reduktion abgeernteter Soja-Knöllchen (von 43 Tage alten Pflanzen) wird nach KOCH and EVANS (1966) durch O_2 (bis zu pO_2 = 0,2) stimuliert und durch weitere O_2-Partialdruck-Erhöhung nicht reduziert. Der pO_2 beeinflußt zudem die Knöllchenatmung durch Veränderung des respiratorischen Quotienten (RQ). Bei niedrigem pO_2 (0,1 atm) ist der RQ abgeernteter Soja-Knöllchen wesentlich größer als 1,0, fällt aber bei 0,3 atm O_2 auf nahezu 1,0 ab. Die Folge ist, daß die N_2-Fixierung bei 0,3 atm O_2 mehr als 10-mal höher ist als bei 0,1 atm O_2 (BERGERSEN, 1971). Die positive Korrelation zwischen Atmung und N_2-Fixierung hängt wahrscheinlich mit der ATP-Versorgung der Nitrogenase durch die oxidative Phosphorylierung zusammen, wobei ein atmosphärischer pO_2 schon limitierend wirkt. BERGERSEN (1962) zeigte anhand abgeernteter Soja-Knöllchen, daß die N_2-Fixierung mit steigenden O_2-Anteil bis zu pO_2 = 30 - 50 % zunimmt. Erst bei O_2-Konzentrationen von 0,5- 0,8 atm ist die N_2-Fixierung gehemmt. Die Knöllchen-Atmung jedoch, nimmt wie die N_2-Fixierung bis zu einem ersten Maximum bei 50 % O_2 zu und erreicht ein zweites Maximum bei etwa 100 % O_2, während die N_2-Fixierung abfällt. Vermutlich hängt die erste Phase der O_2-Verbrauch/pO_2-Beziehung mit dem O_2-Verbrauch des pflanzlichen Gewebes und die zweite Phase mit dem O_2-Verbrauch der Bakteroiden zusammen. Beide Kompartimente sind durch eine O_2-Permeabilitätsbarriere (Infektionsvakuole und Leghämoglobin; TJEPKEMA and YOCUM, 1970; BERGERSEN and GOODCHILD, 1973b; BERGERSEN *et al.*, 1973) voneinander getrennt (s. 3.12.). Erlaubt diese Barriere eine pO_2-Zunahme an und in den Bakteroiden, so könnte das Abfallen der N_2-Fixierung durch Störung der O_2-empfindlichen Nitrogenase (EADY and POSTGATE, 1974; LJONES, 1974; BURNS and HARDY, 1975; BURRIS, 1975) oder durch Konkurrenz um die Reduktionsäquivalente zwischen der N_2-Fixierung und der Atmung erklärt werden (BERGERSEN, 1962).

In Kap. 3.5.3. wurden die Nitrogenase-Aktivitäten während der Entwicklung der Soja-Pflanzen in einer Inkubationsatmosphäre mit 19 und 40 % O_2 (anhand des Wurzelsystems mit Knöllchen) verfolgt. In sehr jungen Knöllchen (Abb. 27; Stadium I) bewirkt die Inkubation in 40 % O_2 noch keine Erhöhung der Nitrogenase-Aktivität gegenüber 19 % O_2. Dies könnte damit erklärt werden, daß die Knöllchenatmung (aufgrund der geringeren Knöllchengrößen und somit Diffusionswege und der geringeren Lb-Konzentration pro Frischgewichtseinheit (s. Abb. 28)) schon bei 19 % O_2 gesättigt ist und eine weitere O_2-Erhöhung auf 40 % keine Steigerung, eher aber eine Hemmung der N_2-Fixierung ergibt. Mit dem Wachstum der Knöllchen (s. Abb. 7, 11) vergrößern sich die Diffusionswege (BERGERSEN and GOODCHILD, 1973a) und verstärken sich die O_2-Permeabilitätsbarrieren um die Bakteroiden aufgrund auch nach dem Maximum der Nitrogenaseaktivität weiter stark ansteigenden Leghämoglobin-Konzentrationen. Die Folge ist, daß in 19 % O_2 die Atmung der Bakteroiden noch nicht gesättigt ist und somit in 40 % noch eine Erhöhung der N_2-Fixierung erfolgt (abb. 27; Stadium II). Mit zunehmendem Knöllchenalter (Stadium III) werden das Leghämoglobin (Abb. 28) und andere Proteine allmählich abgebaut. Dies bedeutet, daß die O_2-Barriere ihre Wirksamkeit verliert und die O_2-Sättigung schon bei niedrigen O_2-Konzentrationen erreicht wird. In sehr alten Knöllchenstadien schließlich (Stadium IV) gibt es keine Unterschiede der Nitrogenase-Aktivität zwischen der Inkubation in 19 % O_2 und 40 % O_2 mehr. Je nach Entwicklungsstadium ist also eine deutliche Steigerung der N_2-Fixierung durch Erhöhung des O_2-Partialdrucks bzw. kein Effekt vorhanden.

Der Einfluß der effektiven und ineffektiven Symbiose auf den Trockengewichtsanteil und auf den C-, H- und N-Gehalt der Knöllchen während der Entwicklung soll nur kurz diskutiert werden. Der Anstieg des Trockengewichtanteils (Abb. 15) vom Frischgewicht korreliert mit dem %-Anteil des N und C vom Trockengewicht (Abb. 16, 18) in effektiven Knöllchen. Die Erhöhung des C-Gehalts in effektiven Knöllchen

ist wahrscheinlich auf die Vermehrung der Bakteroiden im Knöllchengewebe und dem damit verbundenen erhöhten PHBS-Gehalt (s. 3.12.1), welcher bis zu 50 % des Trockengewichts von Bakteroiden in Soja erreichen kann (WONG and EVANS, 1971), und auf die Assimilate, die von den Photosyntheseorten in die Knöllchen gesandt werden, zurückzuführen. In 21 - 30 Tage alten Pflanzen von Pisum sativum (MINCHIN and PATE, 1973) werden 32 % des photosynthetisch gewonnenen Kohlenstoffs in die Knöllchen transportiert; 5 % davon werden für das Wachstum und 12 % in der Atmung verbraucht, und 15 % kehren als Amino-Verbindungen, welche bei der N_2-Fixierung gebildet werden, über das Xylem in den Sproß zurück. Da die Nitrogenase-Aktivität (Abb. 21 - 27) und der lösliche Proteinanteil des pflanzlichen Cytoplasmas (Abb. 19) schon abfallen, während der N-Gehalt noch steigt, ist wahrscheinlich die Zunahme des Stickstoffs besonders auf die Vermehrung des Bakteroiden-Proteins zurückzuführen (Abb. 20). Der deutlich geringere lösliche Proteingehalt im pflanzlichen Cytoplasma ineffektiver Knöllchen ab etwa dem 21. Tag ist vorallem eine Folge des fehlenden Leghämoglobins; dies kann bis zu 40 % des gesamten löslichen Knöllchenproteins während der Blüte erreichen (NASH and SCHULMAN, 1976).

Die C-, H- und N-Gehalte (Abb. 16, 17, 18) in jungen ineffektiven Knöllchen liegen etwa auf gleicher Höhe wie effektive Knöllchen gleichen Alters. Die reservestoffreichen Kotyledonen sind in dieser Zeit möglicherweise noch eine wichtige Quelle für Wachstumsleistung und Energieversorgung der Knöllchen (DERBYSHIRE et al., 1976; MACNICOL, 1977; STOREY and REPORTER, 1978). Abbauprozesse setzen jedoch in ineffektiven Knöllchen relativ früh ein (s. 3.12.2.): der Anteil löslicher Proteine im pflanzlichen Cytoplasma sinkt unter jenen der effektiven Knöllchen (Abb. 19), die Bakteroidenzahl und somit ihr Protein- und Reservestoff-Anteil pro Frischgewichtseinheit ist relativ gering (Abb. 20), N_2-Fixierung findet nicht statt. Die Folge ist die Abnahme des C-, H- und N-Gehalts (Abb. 16, 17, 18) und des Trockengewichtanteils vom Frischgewicht (Abb. 15).

4.2. Verlauf des Leghämoglobingehalts und der spezifischen Aktivitäten einiger am N-Stoffwechsel beteiligten Enzyme während der Knöllchenentwicklung - Zusammenhänge mit der ultrastrukturellen Entwicklung - Vergleich mit freilebenden Rhizobien

Das rote Pigment Leghämoglobin ist ein charakteristisches Merkmal Bakteroiden-enthaltender Zellen von aktiven Wurzelknöllchen. Lb ist außerhalb der Bakteroiden-Zellwand, aber wahrscheinlich innerhalb der Membranhülle (Infektionsvakuole), welche die Bakteroiden umgibt (s. 3.12.), lokalisiert (DILWORTH and KIDBY, 1968; TRUCHET, 1972; BERGERSEN and GOODCHILD, 1973 b). Da bei der Isolierung der Bakteroiden die äußere Membranhülle platzt, wird das Lb in der pflanzlichen rot gefärbten Cytoplasmafraktion bestimmt (s. 2.8., 2.9.). An der Biosynthese des Lb sind sowohl die Pflanze als auch die Bakterien beteiligt (GODFREY et al., 1975). Das Apoprotein Globin ist das Produkt der pflanzlichen Gene (DILWORTH, 1969; BROUGHTON and DILWORTH, 1971; CUTTING and SCHULMAN, 1971), während die prosthetische Gruppe Häm wahrscheinlich bakteriellen Ursprungs ist (CUTTING and SCHULMAN, 1969). BERGERSEN (1971), APPLEBY (1974) und WITTENBERG et al., (1974) unterstützten die Hypothese, daß Lb die O_2-Diffusion in den Knöllchen erleichtert, indem es den Sauerstoff in einer hohen Diffusionsrate verteilt, ihn aber an der Bakteroiden-Oberfläche auf einem niedrigen Partialdruck hält; dies erlaubt sowohl das Funktionieren der O_2-empfindlichen Nitrogenase und des O_2-abhängigen Bakteroiden-Stoffwechsels zur Bildung großer Mengen von ATP, welche für die N_2-Fixierung notwendig sind.

Mehrere Befunde sprechen dafür, daß Lb nicht obligatorisch für die symbiontische N_2-Fixierung ist: 1. Bei freilebenden Rhizobien ist Lb für die Entwicklung der Nitrogenase-Aktivität nicht notwendig (s. 4.1.), 2. Knöllchen, die durch Rhizobien-Infektion der Wurzeln von Trema cannabina (keine Leguminose) entstehen, fixieren in Ab-

wesenheit von Lb Stickstoff (COVENTRY et al., 1976). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß auch keine strenge quantitative Korrelation zwischen Nitrogenase-Aktivität und Lb-Gehalt gegeben ist. DILWORTH and WILLIAMS (1967); BERGERSEN and GOODCHILD (1973b) und ROBERTSON et al. (1975 b) fanden eine Zunahme des Lb-Gehalts, bevor die Knöllchen N zu akkumulieren oder Acetylen zu reuzieren begannen; NASH and SCHULMAN (1976) und BROUGHTON et al. (1978) wiesen vor der Zunahme des Lb-Gehalts N_2-fixierende Aktivität nach. Die Leghämoglobin-Konzentration steigt sowohl in der Sorte Mandarin als auch in der Sorte Caloria während des Abfalls der Nitrogenase-Aktivität bis zum 30. - 35. Tag nach der Infektion noch weiter an (Abb. 28). Ähnliches haben HARDY et al. (1971), JOHNSON and HUME (1973), und NASH and SCHULMAN (1976) berichtet. Der Zerfall des Lb (Abb. 28) ab dem 30. - 35. Tag korreliert mit der Auflösung der Bakteroiden in den infizierten Pflanzenzellen (Abb. 20). Der Befund, daß größere Knöllchen einen höheren Lb-Gehalt aufweisen (Abb. 47), dieser aber nicht mit einer höheren Nitrogenase-Aktivität gekoppelt ist, spricht dafür, daß der Lb-Gehalt eher enger mit der Knöllchengröße als mit der Nitrogenase-Aktivität zusammenhängt. Möglicherweise kompensiert der höhere Lb-Gehalt der größeren Knöllchen ihren erhöhten O_2-Bedarf. Wie NASH and SCHULMAN (1976) jedoch zeigten, spricht das abnehmende Verhältnis von Nitrogenase-Aktivität zu Lb-Gehalt während der Knöllchenentwicklung für eine nicht ganz wirksame Kompensation. Wahrscheinlich werden noch andere für die Nitrogenase-Aktivität wichtige Faktoren, wie z.B. der O_2-Partialdruck (s. 4.1.) innerhalb der Knöllchen limitierend.

Abb. 47 zeigt außerdem, daß bei konstanter Knöllchenzahl pro Pflanze (Abb. 7) gleiche Knöllchengrößen ähnliche Alterungsprozesse (bezogen auf den Lb-Gehalt) durchmachen wie die Gesamtpopulation der Knöllchen (Abb. 28), d.h. daß ein Teil der kleinen und jungen Knöllchen klein bleibt und kleine Knöllchen älterer Pflanzen physiologisch alt sind. Diese parallelen Alterungsprozesse verschiedener Knöllchen-

größen können nicht nur anhand des Lb-Gehalts, sondern auch anhand der Enzymaktivitäten nachgewiesen werden; die spezifischen Aktivitäten sind weniger von der Knöllchengröße als vom Knöllchenalter abhängig (Abb. 48 - 56). Ein starker größenabhängiger Effekt liegt nur bei der ADH aus Bakteroiden vor.

Das Lb wird vermutlich wie das tierische Hämoglobin abgebaut. VIRTANEN and MIETTINNEN (1949) konnten ein grünes Pigment (Legcholeglobin) isolieren; dieses entsteht vermutlich durch Oxydation des Porphyrinrings, der dadurch zwischen zwei Pyrrolringen aufbricht, ohne daß das Globin und das Eisenion (das im Legcholeglobin als Fe^{3+} vorliegt) verloren gehen. Das Legcholeglobin zeigt im Gegensatz zum Leghämoglobin (Abb. 29) keine deutlichen Maxima zwischen 500 und 600 nm im Absorptionsspektrum. Hellgrüne Färbung bei ineffektiven Knöllchen wurde schon von KLÜVER (1948), SMITH (1949), APPLEBY and BERGERSEN (1958) und FALK et al. (1959) beobachtet. Absorptionsspektren von Cytoplasmaextrakten ineffektiver Knöllchen zeigen zwar die Soret-Bande, aber keine Absorptionsmaxima zwischen 500 und 600 nm (Abb. 29). Möglicherweise liegt in ineffektiven Knöllchen eine Verbindung vor, die mit dem Legcholeglobin identisch oder verwandt ist. In aktiven Knöllchen von Lupinus luteus und Ornithopus sativus konnten Lb-Formen nachgewiesen werden, die sich neben dem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht auch in der Farbe (rote, orange und grüne Komponenten) unterschieden (BROUGHTON et al., 1972). Da in den ineffektiven Knöllchen zu keinem Zeitpunkt Lb gefunden wurde, ist es offen, ob das Lb sofort wieder abgebaut wird oder ob die Biosynthese bei grünlichen Zwischenprodukten stehenbleibt. Der frühzeitige Verlust der Infektionsvakuole in ineffektiven Knöllchen (s. 3.12.2.) folgt möglicherweise aus dem Unvermögen des bakteriellen Symbiosepartners, die Komponente Häm vollständig zu synthetisieren. Der Verlust der Vakuole würde dann weitere physiologische Schäden der Bakterien nach sich ziehen.

Im Vergleich zu freilebenden Rhizobien (s. auch Tab. 7), Wurzelgewebe ohne Knöllchen (Tab. 6) und Sproßgewebe konnten in nichtfraktionierten Soja-Knöllchen eines Alters schon hohe Transaminase- und GDH-Aktivitäten bestimmt werden (FOTTRELL and GRIMES, 1966; STRIPF und WERNER, 1976). GRIMES and TURNER (1971) fanden in Knöllchen von Pisum sativum hohe Aktivitäten derselben Enzyme, während GRIMES and MASTERSON (1971) für dasselbe Objekt viel niedrigere Aktivitäten angaben. In fraktionierten Knöllchen von Lupinus spec. fanden KRETOVICH et al. (1969) im pflanzlichen Cytoplasma hohe AST-, ALT- und GDH-Aktivitäten; in Glycine max hingegen konnten RYAN and FOTTRELL (1974) den Hauptanteil der spezifischen Aktivität der AST in den Bakteroiden ausmachen. FOTTRELL and GRIMES (1966) lokalisierten den überwiegenden Anteil der spezifischen Aktivität der ALT im pflanzlichen Cytoplasma von Trifolium repens-Knöllchen. Das bevorzugte Coenzym der pflanzlichen GDH ist NADH; dies wurde auch von WEISSMAN (1972) und DUNN and KLUCAS (1973) bei Glycine max gefunden. (In freilebenden Bakterien und in Bakteroiden von Rhizobium japonicum konnte die Präferenz für NADH bestätigt werden; DUNN and KLUCAS, 1973; BROWN and DILWORTH, 1975; O' GARA and SHANMUGAM, 1976.) Im pflanzlichen Cytoplasma wurden wesentlich höhere spezifische Aktivitäten der GDH (Abb. 34) gefunden, als RYAN and FOTTRELL (1974) und DUNN and KLUCAS (1973) angaben.

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren klar, daß sehr viel höhere spezifische Aktivitäten der AST, ALT und GDH in der pflanzlichen gegenüber der bakteriellen Fraktion vorliegen. Die unterschiedlichen Aktivitäten der zitierten Arbeiten rühren wahrscheinlich daher, daß Knöllchen verschiedenen Alters untersucht wurden. Die enormen Aktivitätsunterschiede der genannten Enzyme im pflanzlichen Cytoplasma während der Knöllchenentwicklung machen die Notwendigkeit deutlich, mit definierten Knöllchenstadien zu arbeiten und als weiteren Parameter z.B. die Nitrogenase-Aktivität anzugeben. Die von RYAN and FOTTRELL (1974) angegebenen niedrigen spezifischen Aktivitäten der AST im pflanzlichen

Cytoplasma könnten deshalb damit erklärt werden, daß nicht mehr im Bereich maximaler Aktivität gemessen wurde.

In den Bakteroiden effektiver Knöllchen betragen die spezifischen Aktivitäten der drei genannten Enzyme während der Phase maximaler Nitrogenase-Aktivität nur 20 - 40 % der Aktivität im pflanzlichen Cytoplasma und nehmen tendenziell ab. PLANQUE et al. (1978) konnten bestätigen, daß in Bakteroiden von Rhizobium leguminosarum die GDH-Aktivität mit zunehmender Bakterienzahl im Knöllchengewebe sank. Die Aktivitäten der GDH in der Bakteroiden-Fraktion sind sehr viel niedriger als im pflanzlichen Cytoplasma. Es ist möglich, daß diese Aktivität aufgrund von Verunreinigungen durch die Komponenten der Pflanzenzelle zustande kommt, obwohl SLOGER (1973) eine NADH-abhängige GDH aus der Bakteroidenfraktion (von Glycine max) isolierte. In ineffektiven Knöllchen zeigen die Enzyme AST (Abb. 31), ALT (Abb. 33) und GDH (Abb. 35) einen ähnlichen Verlauf der spezifischen Aktivitäten im pflanzlichen Cytoplasma; der Aktivitätsverfall der ALT verläuft im senescenten Knöllchenzellen-Plasma besonders rapide. Der Abfall der pflanzlichen Enzyme geht (wie in effektiven Knöllchen) mit der Abnahme des löslichen pflanzlichen Proteins einher (Abb. 19), d.h. trotz stetiger Knöllchenbildungen (Abb. 8) altert die Gesamtpopulation der Knöllchen. Da in den Nitrogenase-inaktiven Knöllchen anfänglich ebenfalls gleich hohe AST-, ALT- und GDH-Aktivitäten wie in effektiven gefunden wurden, darf es als wahrscheinlich gelten, daß der Anstieg dieser Enzyme nicht mit der Nitrogenase-Synthese zusammenhängt, sondern bereits vor der Nitrogenase-Induktion liegt. Möglicherweise sind sie eine Folge der Wachstumsstimulation meristematischer Zellen des Wurzelgewebes während der frühen Infektionsphase durch Rhizobien.

Die Aktivitätsmaxima der AST, ALT und GDH korrelieren mit dem elektronendichten Plasma früher Infektionsstadien effektiver und ineffektiver Knöllchen (s. 3.12.). Das pflanzliche Cytoplasma ist reich an Strukturen, wie Mitochondrien, Endoplasmatisches Reticulum,

Dictyosomen und Ribosomen, die auf eine hohe generelle Syntheseleistung der Zellen hinweisen. Vermutlich spielen die Transaminasen AST und ALT eine wichtige Rolle in der Regulation der Protein-Synthese (WIGHTMAN and FOREST, 1978).

Der Hauptanteil der spezifischen Aktivität der GS konnte in effektiven Knöllchen im pflanzlichen Cytoplasma lokalisiert werden (Abb. 42) (s. auch DUNN and KLUCAS, 1973; BROWN and DILWORTH, 1975; ROBERTSON et al., 1975 a; MCPARLAND et al., 1976; PLANQUE et al., 1977). Im pflanzlichen Cytoplasma von Soja-Knöllchen (von 28 Tage alten Pflanzen) repräsentiert dieses Enzym ungefähr 2 % des gesamten cytoplasmatischen Proteins (MCPARLAND et al., 1976). Die spezifischen Aktivitäten der pflanzlichen GS wurden manchmal zu niedrig bestimmt, da die phenolischen Verbindungen der pflanzlichen Extrakte (s. 2.10.) nicht genügend berücksichtigt wurden (MCPARLAND et al., 1976; PLANQUE et al., 1977) oder möglicherweise nicht im pH-Optimum gemessen wurde (PLANQUE et al., 1977). Im Gegensatz zu den Transaminasen und der GDH steigt die spezifische Aktivität dieses Enzyms (entgegen dem Abfall des löslichen pflanzlichen Proteins (Abb. 19)) um ein Vielfaches an (Abb. 42, 45). Allerdings sind die Werte sehr davon abhängig, ob der Biosynthese- oder Transferase-Test zur Bestimmung der Aktivitäten herangezogen wird; außerdem sind der pH-Wert, der Einfluß von Mn^{2+}- und Mg^{2+} -Ionen und andere Faktoren bedeutend (GINSBURG and STADTMAN, 1973). Die Biosynthese-Aktivität des pflanzlichen Enzyms ist bei seinem pH-Optimum mit Mg^{2+} ungefähr dieselbe wie jene mit Mn^{2+}, während die Transferase-Aktivität in Abhängigkeit von Mn^{2+} beim pH-Optimum von 6,5 ein Mehrfaches der Aktivität mit Mg^{2+} bei pH 7,5 ergibt (MCPARLAND et al., 1976). Der Biosynthese-Test ist störanfälliger als der Transferase-Test; insbesondere wirkt das gebildete ADP als starker Inhibitor der GS (ELLIOTT, 1955; MCPARLAND et al., 1976). (Aus diesem Grund wurde ein ATP-regenerierendes System verwendet.) Außerdem kann eine hohe ATPase-Aktivität (ELLIOTT, 1955; HENDRIX and KENNEDY, 1977) problematisch werden.

Aus mehreren Arbeiten ist ersichtlich, daß bei verschiedenen Organismen mit Hilfe des Transferase-Tests wesentlich höhere Aktivitäten als mit dem Biosynthese-Test gefunden werden (HUBBARD and STADTMAN, 1967; NAGATANI et al., 1971; DHARMAWARDENE and STEWART, 1972; WEISSMAN, 1972; ROBERTSON et al., 1975 a; MCPARLAND et al., 1976; PLANQUE et al., 1977). In Tab. 8 ist eine Reihe von Organismen (vor allem Mikroorganismen) aufgeführt, die sich wesentlich im Verhältnis der spezifischen Aktivitäten des Transferase-Tests zu jener des Biosynthese-Tests unterscheiden. Wie ist das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der GS im pflanzlichen Cytoplasma bei dem hier verwendeten Organismus, und wie ist der Verlauf während der Entwicklung ? Abb. 45 macht deutlich, daß die Biosynthese-Aktivität fast konstant nur 2,71 $\pm$ 0,41 % der Aktivität des Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Tests während der Knöllchenentwicklung beträgt. Dieser gleiche Aktivitätsanstieg und das gleiche pH-Optimum (Abb. 4) der GS bei beiden Test-Typen spricht dafür, daß es sich um ein und dasselbe Enzym handelt. Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten der GS, bestimmt nach dem Mn^{2+}- und Mg^{2+}-abhängigen Transferase-Test, ergibt jedoch einen steigenden prozentualen Anteil der Aktivität des Mg^{2+}-abhängigen vom Mn^{2+}-abhängigen Test (Abb. 45). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß während der Entwicklung trotz Aktivitätsanstieg eine Konformationsänderung des Enzyms stattfindet.

Die GS-Aktivitäten aus dem pflanzlichen Cytoplasma ineffektiver Knöllchen übertreffen kaum jene in 15 - 17 Tage alten effektiven Knöllchen (Abb. 44). Die stark steigende Aktivität der pflanzlichen GS setzt also wahrscheinlich die Induktion des bakteriellen nif-Gens (zur Synthese der Nitrogenase) voraus. Die prozentualen Anteile der Biosynthese- und Mg^{2+}-abhängigen Transferase-Aktivität von der Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Aktivität (Abb. 46) unterstützen die im vorigen Abschnitt getroffenen Aussagen.

Dieselben niedrigen GS-Aktivitäten (Mn^{2+}-abhängiger Transferase-Test) in Bakteroiden effektiver Knöllchen wurden in Stadien mit hoher

Tab. 8: Spezifische Aktivitäten der Glutamin-Synthetase in verschiedenen Organismen. Das Verhältnis B/A gibt das Verhältnis der spezifischen Aktivität des Transferase-Tests zu jener des Biosynthese-Tests an.

[a] Der Mg^{2+}-abhängige Biosynthese-Test wurde durch Bestimmung des gebildeten P_i, des gebildeten γ-Glutamylhydroxamats oder des gebildeten Glutamins durchgeführt; die spezifische Aktivität wird in µmol P_i bzw. γ-Glutamylhydroxamat bzw. Glutamin x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$ angegeben.

[b] Der Mn^{2+}-abhängige Transferase-Test wurde durch Bestimmung des gebildeten γ-Glutamylhydroxamats durchgeführt; die spezifische Aktivität wird in µmol γ-Glutamylhydroxamat x min^{-1} x mg $Protein^{-1}$ angegeben.

Organismus	Testbedingungen Biosynthese-Test ($+Mg^{2+}$)	Testbedingungen Transferase-Test ($+Mn^{2+}$)	Spezifische Aktivitäten Biosynthese-Test[a] (A)	Spezifische Aktivitäten Transferase-Test[b] (B)	Verhältnis B/A	Literatur
Klebsiella pneumoniae	pH 7,4,37°C Glutamin-Bestimmung	pH 7,4,37°C	0,24	0,653	2,7	Nagatani,H. et al. (1971)
Anabaena cylindrica	pH 7,2,37°C P_i-Best.	pH 7,2,37°C	0,048	1,73	36,0	Dharmawardene,M.W.N. and W.D.P. Stewart (1972)
Salmonella typhimurium	pH 7,0,37°C P_i-Best.	pH 7,0,37°C	1,08	6,29	5,8	Hubbard,J.S. and E.R. Stadtman (1967)
Micrococcus sodonensis	pH 7,0,37°C P_i-Best.	pH 7,0,37°C	0,09	3,56	39,6	"
Bacillus licheniformis	pH 7,0,37°C P_i-Best.	pH 7,0,37°C	0,39	0,05	0,13	"
Bacillus cereus	pH 7,0,37°C P_i-Best.	pH 7,0,37°C	1,75	6,08	3,5	"
Clostridium pasteurianum	pH 7,0,30°C P_i-Best.	pH 7,0,30°C	0,81	21,1	26,1	"
Rhodospirillum rubrum	pH 7,0,30°C P_i-Best.	pH 7,0,30°C	0,75	18,8	25,1	"
Candida utilis	pH 7,0,30°C P_i-Best.	pH 7,0,30°C	0,81	39,8	49,1	"
Neurospora crassa	pH 7,0,30°C P_i-Best.	pH 7,0,30°C	0,94	2,3	2,5	"
Chlorella pyrenoidosa	pH 7,0,37°C P_i-Best.	pH 7,0,37°C	0,34	2,45	7,2	"
Rhizobium lupini (Bakteroiden)	pH 7,2,37°C γ-Glut.-Best.	pH 7,3,37°C	0,0013	0,134	103,3	Planqué,K. et al. (1977)
Lupinus luteus (Kn.-Cytopl.)	pH 7,2,37°C γ-Glut.-Best	pH 7,3,37°C	0,0044	0,0418	9,5	"

und niedriger Nitrogenase-Aktivität gefunden (Abb. 43). Obwohl die GS-Aktivitäten in den Bakteroiden-Extrakten mit Hilfe des Transferase-Tests (DUNN and KLUCAS, 1973; KURZ et al., 1975) und des Biosynthese-Tests (BROWN and DILWORTH, 1975; ROBERTSON et al., 1975 a; PLANQUE et al., 1977) bestimmt wurden, konnten während der Knöllchenentwicklung auch nur niedrige Aktivitäten festgestellt werden (KURZ et al., 1975: während maximaler Nitrogenase-Aktivität; ROBERTSON et al., 1975 a). In Rhizobium leguminosarum nahm die GS-Aktivität mit steigender Nitrogenase-Aktivität ab (PLANQUE et al., 1978). Im Gegensatz zu Rhizobium leguminosarum-Bakteroiden, wo die GS hoch adenylyliert ist (KURZ et al., 1975; PLANQUE et al., 1978) liegt sie in Rhizobium japonicum in teilweise adenylylierter Form vor (BISHOP et al., 1976), verändert sich aber nicht, wenn sowohl die Knöllchen als auch die isolierten Bakteroiden höheren NH_4^+-Konzentrationen ausgesetzt werden, bei denen schon die Nitrogenase-Aktivitäten reduziert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß während der Entwicklung in effektiven Bakteroiden ein konstanter relativer Adenylylierungsgrad von 1,4 $\pm$ 0,2 vorliegt (s. 3.7.7.1.). Dies führt zu der Annahme, daß das Adenylylierungs-Kaskade-System (wie im pflanzlichen Cytoplasma; MCPARLAND et al., 1976) in den Bakteroiden nicht funktioniert. Das Adenylylierungssystem der GS spielt in Klebsiella eine wichtige Rolle in der Regulation der Nitrogenase (TUBB and POSTGATE, 1973; STREICHER et al., 1974; TUBB, 1974). Die GS wird durch NH_4^+ inaktiviert (Bindung von Adenylyl-Gruppen); die Nitrogenase-Synthese erfordert aber in Klebsiella die Gegenwart von biosynthetisch aktiver (nichtadenylylierter) GS. Der Mn^{2+}-abhängige Transferase-Test ist ein Maß für die insgesamt vorliegende GS, da in diesem Test sowohl die adenylylierte als auch die nichtadenylylierte Form aktiv ist, während in Abhängigkeit von Mn^{2+} + Mg^{2+} die nichtadenylylierte Form aktiv ist (BISHOP et al., 1976). Der relative Adenylylierungsgrad wird gebildet aus dem Verhältnis der Ergebnisse des Mn^{2+} - und Mg^{2+}-abhängigen Tests. Ein Wert von 1,00 oder weniger zeigt die Abwesenheit

von adenylyliertem Enzym an, und ein Wert größer als 1,00 weist auf die Gegenwart von adenylyliertem Enzym hin.

In freilebenden Rhizobien haben verschiedene Arbeitsgruppen das Verhältnis zwischen GS und Nitrogenase studiert und kamen dabei zu verschiedenen Ergebnissen. BISHOP et al. (1976), O'GARA and SHANMUGAM (1976) und SCOWCROFT et al. (1976) kamen zu dem Schluß, daß die GS nicht die Nitrogenase über NH_4^+ reprimiert. Andererseits fanden BERGERSEN and TURNER (1976), KONDOROSI et al. (1977), LUDWIG and SIGNER (1977) und UPCHURCH and ELKAN (1978) einen positiven Hinweis für die Rolle der GS in der Kontrolle der Nitrogenase-Synthese. Der Vergleich zwischen dereprimierten mikroaerophil gewachsenen und reprimierten aerob gewachsenen freilebenden Bakterien von Rhizobium japonicum 61-A-101 und Bakteroiden zeigt eine negative Korrelation zwischen der Nitrogenase-Aktivität einerseits und der GS-Aktivität andererseits (Tab. 7).

Neuerdings wurde eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen GS-Aktivitäten gefunden. Freilebende Bakterien von Rhizobium japonicum enthalten zwei Formen der Glutamin-Synthetase: GS I und GS II (DARROW and KNOTTS, 1977). Unter mikroaerophilen Bedingungen gewachsene Rhizobien enthalten nur GS I, die hoch adenylyliert ist (RAO et al., 1978); bei wachsender O_2-Konzentration sinkt der Adenylylierungsgrad reversibel (FUCHS and KEISTER, 1978). GS I ist weitgehend konstitutiv und zeigt eine geringe katalytische Aktivität. Die unter aeroben Bedingungen gewachsenen Bakterien weisen beide Formen auf. Die GS II wird nicht adenylyliert und wird nur unter NH_4^+-limitierten Bedingungen induziert, während sie bei NH_4^+-Überschuß reprimiert wird (DARROW and KNOTTS, 1978; LUDWIG, 1978).

In ineffektiven Knöllchen ist in der Bakteroiden-Fraktion ein Aktivitätsanstieg der GS auf das 3 - 4-fache der Aktivität in effektiven Bakteroiden feststellbar (Abb. 44). Da in diesen Knöllchen das O_2-Schutzsystem des Leghämoglobins fehlt, die Bakterien allmählich die Infektionsvakuole verlieren (s. 3.12.2.) und die Knöllchen kleiner als effektive bleiben (wobei die Diffusionswege geringer sind),

könnten die Symbionten einer erhöhten O_2-Konzentration ausgesetzt sein, die zur Induktion von GS II führt. Da keine Nitrogenase-Aktivität meßbar ist, würde dieses Enzym auch nicht durch NH_4^+ reprimiert.

Die Rolle der Glutamat-Synthase im N-Stoffwechsel ist sehr umstritten. In Übereinstimmung mit DUNN and KLUCAS (1973) und RYAN and FOTTRELL (1974) wurde der Hauptanteil der spezifischen Aktivität sowohl in effektiven als auch in ineffektiven Knöllchen in den Bakteroiden lokalisiert (Abb. 40, 41). KURZ et al. (1975) fanden sehr niedrige Aktivitäten in Bakteroiden von Rhizobium leguminosarum und zweifelten die Existenz des Enzyms an. PLANQUE et al. (1977) konnten keine Aktivitäten in demselben Organismus messen, während sie in Bakteroiden von Rhizobium lupini Aktivität fanden. ROBERTSON et al. (1975 a) berichteten von einem deutlichen Anstieg der GOGAT-Aktivitäten (ähnlich der GS-Aktivität) in der pflanzlichen Fraktion von Lupinen, wenn sie die Extrakte zur Entfernung enzymhemmender niedermolekularer Verbindungen, wie z.B. Glutamat und Glycin, vor der Bestimmung durch eine Sephadex G 25-Säule laufen ließen, und folgerten daraus, daß dies ein Grund dafür sei, daß das Enzym in der pflanzlichen Fraktion von Knöllchen nicht deutlich gemessen werden konnte (DUNN and KLUCAS, 1973; RYAN and FOTTRELL, 1974; BROWN and DILWORTH, 1975). Für die hier verwendeten Extrakte wurde dies nachvollzogen; es konnten aber keine höheren Aktivitäten nach dem Säulendurchfluß festgestellt werden. Allerdings hat es sich erwiesen, daß die pflanzliche Glutamat-Synthase von allen untersuchten Enzymen im Rohextrakt am instabilsten war (s. 3.8.). Möglicherweise wird dieses Enzym sehr leicht inaktiviert, oder es liegen Isoenzyme unterschiedlicher Stabilität vor. Auffällig sind die sehr geringen Aktivitäten im pflanzlichen Cytoplasma ineffektiver Knöllchen gegenüber effektiven (Abb. 41), die auf einen Zusammenhang zwischen der pflanzlichen Glutamat-Synthase und der Nitrogenase, ähnlich wie bei der pflanzlichen GS hinweisen könnten.

Die hohen spezifischen Aktivitäten der Transaminasen, GDH und GS im pflanzlichen Cytoplasma lassen vermuten, daß der Hauptanteil des in den Bakteroiden fixierten Stickstoffs im pflanzlichen Cytoplasma assimiliert wird. Diese Aussage wird durch folgende Befunde unterstützt: KLUCAS (1974) fand in Soja-Knöllchen den Hauptanteil des NH_4^+ im pflanzlichen Cytoplasma. Soja-Knöllchen, die $^{15}N_2$ inkorporieren, zeigen zuerst Kontamination der die Bakteroiden umgebenden intrazellulären Membranhüllen und später zunehmende ^{15}N-Konzentration in der löslichen Fraktion der Knöllchen (BERGERSEN, 1960). Dies führt zu der Vorstellung, daß der Hauptanteil des fixierten Stickstoffs als NH_4^+ aus den Bakteroiden ausgeschleust wird (BERGERSEN, 1965).

Kontrovers ist die Diskussion über den Weg der Assimilation im Knöllchencytoplasma. Für die Bildung des Glutamat und Glutamin als erste Assimilationsprodukte wird die Beteiligung der Enzyme GDH, GOGAT und GS diskutiert. ZELITCH et al. (1952) konnten in Soja-Knöllchen mit ^{15}N-Markierungsexperimenten zeigen, daß Glutamat ein primäres Assimilationsprodukt sein muß. KENNEDY (1966 a, b) konnte in Serradella-Knöllchen Glutamat und Glutamin als Aminoverbindungen ausmachen, die von $^{15}N_2$ gebildet wurden; Aspartat, Alanin und Asparagin waren sekundären Ursprungs. MULDER et al. (1959) konnten anhand von Molybdän-Mangelpflanzen (Medicago), die dadurch unfähig waren N_2 zu fixieren, bei Mb-Zugabe eine schnelle Zunahme von Glutamat feststellen; Alanin und Aspartat nahmen langsamer zu und ein Asparagin-Anstieg konnte erst spät gemessen werden. In Kurzzeit-Markierungsexperimenten wurde Glutamin als das erste organische Produkt der Fixierung von $[^{13}N]N_2$ durch isolierte Soja-Knöllchen bestimmt. Nach 15 min waren die meisten ^{13}N-markierten organischen Produkte Glutamat und Alanin, während Glutamin nur noch in geringer Konzentration auftrat (MEEKS et al., 1978). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß der primäre Weg zur Assimilation des fixierten Stickstoffs über die Enzyme GS und GOGAT und nicht über die GDH führt. Die K_m-Werte von GS und GDH deuten auf eine viel höhere Affinität der GS für NH_4^+ an (MIFLIN and LEA, 1977).

Falls diese Werte die Situation in vivo widerspiegeln, ist es unwahrscheinlich, daß die GDH unter Bedingungen von geringer NH_4^+-Verfügbarkeit wirksam wird. Ob dies während der Entwicklung der Pflanze innerhalb des pflanzlichen Cytoplasmas der Knöllchen immer der Fall ist, bleibt fraglich. Die Transaminasen AST und ALT spielen im pflanzlichen Cytoplasma auf jeden Fall eine wichtige Rolle in der Synthese weiterer Aminosäuren.

Widersprüchlich sind auch die Meinungen über den Mechanismus der NH_4^+-Assimilation in den Bakteroiden, die dort wohl in einem begrenzten Ausmaß stattfindet. Die Produkte der NH_4^+-assimilierenden Enzyme der Bakteroiden könnten einmal zu einer adäquaten Versorgung mit Aminosäuren bei der Bakteroiden-Proteinbiosynthese dienen und darüber hinaus durch ihre Ausscheidung aus den Bakteroiden, deren Membran durchlässiger wird (VAN BRUSSEL, 1973), den Aminosäure-Pool des pflanzlichen Cytoplasmas vergrößern. Die geringen GDH-Aktivitäten in den Bakteroiden und der Befund, daß sowohl in Nitrogenase-Aktiven als auch -inaktiven freilebenden Zellen keine GDH-Aktivität meßbar ist (Tab. 7), sprechen dafür, daß der GS-GOGAT-Assimilationsweg in Rhizobien wirksam ist. DUNN and KLUCAS (1973) fanden in Bakteroiden ebenfalls sehr niedrige Aktivität; BERGERSEN and TURNER (1976) konnten in einem "cowpea"-Rhizobienstamm keine GDH-Aktivität feststellen. Die niedrigen K_m-Werte der GS für NH_4^+ ($1{,}6 \times 10^{-4}$ M und $1{,}0 \times 10^{-3}$ M, SLOGER, 1973) und der GOGAT (für Glutamin: $9{,}3 \times 10^{-5}$ M; für α-Ketoglutarat: $8{,}1 \times 10^{-6}$ M; DUNN and KLUCAS, 1973) und der hohe K_m der GDH für NH_4^+ ($7{,}3 \times 10^{-2}$ M; DUNN and KLUCAS, 1973) sprechen dafür, daß das GS-GOGAT-System eine schnelle N_2-Fixierungsrate bei niedrigen Gleichgewichtskonzentrationen von NH_4^+ und α-Ketoglutarat erlaubt.

Neben der positiven Korrelation zwischen den spezifischen Aktivitäten der AST, GOGAT und GS in dereprimierten freilebenden Rhizobien und Bakteroiden (Tab. 7) sind die Aktivitäten der ADH von allen getesteten Enzymen in den beiden genannten Zelltypen besonders ähnlich. Dieses Enzym wurde intensiv in Anabaena cylindrica studiert (STEWART

et al., 1975; ROWELL and STEWART, 1976). Die spezifische Aktivität in N_2-fixierenden Kulturen war etwa dreimal höher in Heterocysten als in vegetativen Zellen. Andererseits war in Stickstoff-Mangelkulturen die Aktivität in vegetativen Zellen höher als in Heterocysten. Dennoch vermuteten die Autoren, daß das neugebildete NH_4^+ in N_2-fixierenden Kulturen durch dieses Enzym nicht in organische Verbindungen eingebaut wird. Da die spezifische Aktivität in den Heterocysten von Anabaena cylindrica nur etwa 20 % von jener in Bakteroiden und Nitrogenase-aktiven freilebenden Zellen von Rhizobium japonicum beträgt, ist dies möglicherweise für Rhizobium doch der Fall. Für eine mögliche wichtige Beteiligung der ADH an der NH_4^+-Assimilation sprechen neben dem zur Nitrogenase-Aktivität parallelen Induktionsverlauf die in ineffektiven Bakteroiden gefundenen niedrigen spezifischen Aktivitäten, die nur 1/6 der höchsten Werte aus effektiven Knöllchen ausmachen (Abb. 36, 37) und die deutlichen ADH-Aktivitäten in dereprimierten freilebenden Rhizobien, im Gegensatz zu den reprimierten Zellen. In den Bakteroiden könnte die ADH mit steigender Fixierungsrate, wenn NH_4^+ im Überschuß produziert wird, und diese Rate die Rate der NH_4^+-Assimilation über den GS-GOGAT-Weg überschreitet, zunehmend an Bedeutung gewinnen, da der K_m für NH_4^+ im Vergleich mit GS und GOGAT (s. oben) höher liegt ($7{,}4 \times 10^{-3}$ M; DUNN and KLUCAS, 1973). Alanin, als Inhibitor der bakteriellen GS (DUNN and KLUCAS, 1973), würde die NH_4^+-Assimilation über den GS-GOGAT-Weg herabsetzen. SHAPOSHNIKOV et al. (1976) stellten fest, daß der Gehalt an Phenylalanin in Bakteroiden von Lupinen mit dem täglichen Rhythmus der N_2-Fixierungsrate korreliert. AGARWAL and META (1976) kennzeichneten Alanin im löslichen und strukturgebundenen Protein der Bakteroiden von Phaseolus als die am häufigsten auftretende Aminosäure. SHAPOSHNIKOV et al. (1976) beschrieben Alanin als eine am stärksten vertretene Aminosäure in den Bakteroiden während der Knöllchenbildung von Lupinus nach Erreichen des Aktivitätsmaximums der Nitrogenase. Diese Befunde sprechen für eine wichtige Rolle der ADH im anabolischen Stoffwechsel.

Ähnlich wie die ADH weist die 3-HBDH einen deutlichen Aktivitätsanstieg in den Bakteroiden während der Knöllchenentwicklung auf. Die Poly-ß-Hydroxybuttersäure, die bis zu 50 % des Trockengewichts von Bakteroiden aus Glycine max repräsentieren kann (WONG and EVANS, 1971) und in deutlichen elektronendurchlässigen Akkumulationen sichtbar ist (s. 3.12.1.), dient als aktiver Metabolitpool zur Aufrechterhaltung der N_2-Fixierung bei eingeschränkter Verfügbarkeit von Assimilaten, die das Kohlenstoff-Skelet der Aminosäure-Biosynthese liefern und möglicherweise auch als Quelle für Metabolite, die im Elektronen-Transportsystem zur Nitrogenase erforderlich sein können (KLUCAS and EVANS, 1968; WONG and EVANS, 1971; WONG et al., 1971; ROMANOV et al., 1975; KRETOVICH et al., 1977; GERSON et al., 1978). Die Bakteroiden besitzen ein depolymerisierendes System, welches die Hydrolyse der PHBS katalysiert (WONG and EVANS, 1971). Dieses besteht aus einer Poly-ß-Hydroxybutyrat-Depolymerase, welche die Hydrolyse zur 3-Hydroxybuttersäure katalysiert. Die 3-HBDH katalysiert die Oxydation der 3-Hydroxybuttersäure unter Reduktion von NAD in Richtung Acetoacetat. Unklar ist, warum in älteren Bakteroiden, das Polymer verstärkt eingelagert wird, während die Nitrogenase-Aktivität absinkt (Abb. 38). Ein genereller Mangel an C-Verbindungen wie es im erschöpften Stärkepool der Pflanzenzellen sichtbar wird (Abb. VII) kann damit nicht die Ursache sein. Der zunehmenden Einlagerung von PHBS (s. 3.12.1.) entspricht der Anstieg der 3-HBDH. Der sortenspezifische Unterschied zwischen Caloria und Mandarin macht den Einfluß der Wirtspflanze auf die Bildung des Reservestoffs sichtbar. Er ist ebenfalls in der ineffektiven Symbiose (Abb. 39) feststellbar. In ineffektiven Knöllchen ist zwar auch ein Anstieg der spezifischen Aktivitäten meßbar, aber die absoluten Werte bleiben wesentlich unter jenen der effektiven und fallen sogar in älteren Knöllchenstadien ab. Mit den niedrigen Aktivitäten der 3-HBDH geht auch eine sehr geringe Einlagerung von PHBS in den Bakterienzellen einher (s. 3.12.2.). Diese Beobachtung könnte eventuell mit dem Verlust der Infektionsvakuole der früh degenerierenden Bakterien und der mangelnden Verfügbarkeit von Assimilaten der chlorotischen Pflanzen erklärt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Infektion verschiedener Sorten von Glycine max (Caloria, Mandarin und Chippewa 64) mit effektiven Stämmen von Rhizobium japonicum (61-A-101 und 3I1b85) ergibt ab dem 15. Tag nach der Infektion 14 Tage vorgekeimter Pflanzen eine konstante Knöllchenzahl pro Pflanze und innerhalb von 30 Tagen eine Gewichtszunahme von etwa 2 auf 14 mg Frischgewicht pro Knöllchen. Es konnten keine Sorten- und Stamm-Abhängigkeiten festgestellt werden.
2. Die Infektion der Sorten Caloria und Mandarin mit einem ineffektiven Rhizobienstamm (61-A-24) führt zu einer Erhöhung der Knöllchenzahl mindestens bis zum 50. Tag, während das mittlere Frischgewicht eines Knöllchens unter 4 mg bleibt. Die Zahl und das mittlere Frischgewicht der gebildeten Knöllchen ist zudem unterschiedlich bei verschiedenen Sojasorten.
3. Die Größenverteilungsdiagramme der Knöllchen zeigen, daß ineffektive Knöllchen während der Entwicklung wesentlich kleiner bleiben als effektive. Auch hier unterscheiden sich die Sorten.
4. Verschiedene Perlite-Bodensorten wirken sich unter "normalen" und Wasser-Mangel-Bedingungen unterschiedlich auf das Knöllchenwachstum aus.
5. Der Trockengewichtsanteil vom Frischgewicht und der C- und N-Gehalt effektiver Knöllchen steigen während der Entwicklung allmählich an, während in ineffektiven Knöllchen nur ein kurzfristiger Anstieg und dann ein Abfall feststellbar ist. Der CHN-Gehalt von Wurzelgewebe ohne Knöllchen ähnelt den Werten von älteren ineffektiven Knöllchen.
6. Der Proteingehalt der Cytoplasmaextrakte (bezogen auf 1 g Knöllchen-Frischgewicht) nimmt während der Entwicklung in ineffektiven Knöllchen stärker als in effektiven ab.

   Das pro g Knöllchen-Frischgewicht aus effektiven Bakteroiden

extrahierte lösliche Protein zeigt ein deutliches Maximum zwischen dem 30. und 40. Tag. In ineffektiven Knöllchen hingegen weisen die Werte auf einen wesentlich geringeren Anteil infizierter Zellen im Gewebe hin.

7. a) Pflanzen von Glycine max var. Caloria und var. Chippewa 64, infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101 und 3I1b85, entwickeln ein scharfes Maximum der spezifischen und der Gesamt-Nitrogenase-Aktivität um den 20. Tag nach der Infektion, gefolgt von einer langen Periode reduzierter Aktivität. In der Sorte Mandarin wurde ein höheres und breiteres Maximum gefunden. Die Blüte endet etwa mit oder kurz nach dem Maximum der Nitrogenase-Aktivität. In ineffektiven Knöllchen wurden zu keinem Zeitpunkt Nitrogenase-Aktivitäten festgestellt.

   b) Es konnte kein Unterschied der Nitrogenase-Aktivität 4 h und 8 1/2 h nach Beginn der Lichtphase bei den Sorten Mandarin und Caloria am 21. Tag nach der Infektion festgestellt werden.

   c) Die Inkubation des Wurzelsystems mit Knöllchen (Sorte Caloria) in einer 40 % O_2-Atmosphäre zeigt vom 15. Tag an erst nach einer Anlaufphase von einigen Tagen signifikant höhere Werte als in 19 % O_2. In älteren Stadien wird dieser Effekt langsam wieder aufgehoben.

8. Der Leghämoglobingehalt pro g Knöllchen-Frischgewicht von effektiven Knöllchen (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101) der Sorten Mandarin und Caloria zeigt zwischen dem 30. und 35. Tag ein Maximum.

   Ineffektive Knöllchen sind weiß bis grünlich; ihre pflanzlichen Cytoplasma-Extrakte besitzen zwar die Soret-Bande aber im Gegensatz zu den effektiven Knöllchen keine α- und ß-Bande des Leghämoglobins.

9. a) Die spezifischen Aktivitäten der AST, ALT und GDH durchlaufen im pflanzlichen Cytoplasma effektiver Knöllchen der Sorten Mandarin und Caloria (infiziert mit Rhizobium japonicum 61-A-101)

etwa zum Zeitpunkt höchster Nitrogenase-Aktivität ein frühes Maximum. Der Aktivitätsanstieg liegt jedoch vor der Nitrogenase-Induktion. Ähnliches gilt für das pflanzliche Cytoplasma ineffektiver Knöllchen ohne meßbare Nitrogenase-Aktivität.

b) Die spezifischen Aktivitäten der genannten Enzyme zeigen in effektiven und ineffektiven Bakteroiden wesentlich geringere Werte als in der pflanzlichen Fraktion und fallen während der Entwicklung ab.

10. a) Die GOGAT-Aktivitäten sind in effektiven Bakteroiden 2 - 3-mal höher als im pflanzlichen Cytoplasma und nehmen leicht zu.

b) In ineffektiven Knöllchen wurde in den Bakteroiden derselbe Verlauf gefunden, im pflanzlichen Cytoplasma war jedoch eine noch geringere Aktivität als in effektiven Knöllchen vorhanden.

11. a) Die mit dem Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Test bestimmte Aktivität der GS des pflanzlichen Cytoplasmas effektiver Knöllchen zeigt während der Entwicklung einen starken Aktivitätsanstieg.

b) Der Anteil der Mg^{2+}-abhängigen Transferase-Aktivität von der Mn^{2+}-abhängigen nimmt während der Entwicklung zu, bleibt aber absolut gesehen unter der Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Aktivität.

c) Die Biosynthese-Aktivität beträgt während der Entwicklung konstant 2,71 $\pm$ 0,41 % der Mn^{2+}-abhängigen Transferase-Aktivität.

d) In ineffektiven Knöllchen erreicht die pflanzliche GS nur 12 - 16 % der höchsten Werte effektiver Knöllchen. Die Aussagen b) und c) lassen sich ungefähr auch auf die GS aus pflanzlichem Cytoplasma ineffektiver Knöllchen übertragen.

e) In effektiven Bakteroiden wird eine konstant niedrige Aktivität gefunden.

f) Die GS-Aktivitäten aus ineffektiven Bakteroiden übertreffen die spezifischen Aktivitäten aus effektiven Zellen um das 3 - 4-fache.

12. a) In ineffektiven Knöllchen weist die bakterielle ADH, ähnlich wie die pflanzliche GS einen Aktivitätsanstieg auf.
    b) Die ADH ineffektiver Knöllchen erreicht nur etwa 1/6 der Aktivität in effektiven Knöllchen.
13. a) Die Aktivitäten der bakteriellen 3-HBDH nehmen in effektiven Knöllchen ähnlich wie die ADH zu.
    b) In ineffektiven Knöllchen erreicht die 3-HBDH nur halb so hohe Werte wie in effektiven. In älteren Knöllchenstadien ist ein Aktivitätsabfall feststellbar.
14. Ein Vergleich der Stabilität der pflanzlichen und bakteriellen Enzyme im Rohextrakt bei 0 - 4° C macht eine besondere Instabilität der pflanzlichen Glutamat-Synthase deutlich.
15. In Wurzelgewebe ohne Knöllchen werden im Vergleich zu den Enzymen aus pflanzlichem Knöllchen-Cytoplasma relativ niedrige Aktivitäten gemessen. Der lösliche Proteingehalt ist sehr niedrig.
16. Größenklassen von effektiven Knöllchen machen während der Entwicklung dieselben Alterungsprozesse durch wie die Gesamtpopulation der Knöllchen.
    a) Der Leghämoglobingehalt ist sowohl vom Knöllchenalter als auch von der Knöllchengröße abhängig.
    b) Die spezifischen Aktivitäten der pflanzlichen Enzyme AST, ALT, GDH, GOGAT und GS sind kaum von der Knöllchengröße abhängig.
    c) Unter den bakteriellen Enzymen AST, ALT, GDH und ADH zeigt nur die ADH eine deutliche Größenabhängigkeit.
17. Die spezifischen Aktivitäten der ADH, AST und, mit viel niedrigeren Aktivitäten, der GOGAT in Nitrogenase-aktiven freilebenden Zellen ähneln mehr den Bakteroiden als den Nitrogenase-reprimierten freilebenden Zellen von Flüssigkeitskulturen. Die Aktivitäten in Nitrogenase-reprimierten Zellen waren etwa 50 % niedriger. Die GS-Aktivität war in Bakteroiden und Nitrogenase-aktiven Zellen ähnlich, betrug aber nur etwa 25 - 30 % jener, welche in Nitrogenase-reprimierten Zellen von Rhizobium japonicum gefunden wurde.

18. Die ultrastrukturelle Entwicklung effektiver und ineffektiver Wurzelknöllchen wird ausführlich anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen dargestellt. Im Vergleich mit effektiven Knöllchen setzen in ineffektiven Abbauprozesse früher ein. Die Bakterien verlieren die Infektionsvakuole, und die Degeneration des Wirt-Cytoplasmas setzt ein, bevor die Bakterien absterben. Es wird deutlich weniger PHBS akkumuliert, und Stärke wird nicht oder nur unvollständig abgebaut. Insgesamt sind weniger Zellen infiziert.

6. LITERATUR

AGARWAL, A.K. and S.L. MEHTA: Characterization of soluble and structural proteins of Rhizobium cells and bacteroids from root nodules. Indian. J. Biochem. Biophys. 13, 170 - 173 (1976).

ANDERSON, J.W.: Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. Phytochem. 7, 1973 - 1988 (1968).

APPLEBY, C.A.: Properties of leghaemoglobin in vivo, and its isolation as ferrous oxyleghaemoglobin. Biochim. Biophys. Acta 188, 222 - 229 (1969).

APPLEBY, C.A.: Leghemoglobin. In: The biology of nitrogen fixation (Quispel, A.,ed.), 521 - 554, North Holland Publ., Amsterdam (1974).

APPLEBY, C.A. and F.J. BERGERSEN: Cytochromes of Rhizobium. Nature 182, 1174 (1958).

BALASUNDARAM, V.R. and A. SEN: Stepwise selection of efficient rhizobial cultures through cultural characteristics. Zbl. Bakt., II. Abt. 132, 623 - 627 (1977).

BASSETT, B., R.N. GOODMAN and A. NOVACKY: Ultrastructure of soybean nodules. I: release of rhizobia from the infection thread. Can. J. Microbiol. 23, 573 - 582 (1977).

BERGERSEN, F.J.: Incorporation of $^{15}N_2$ into various fractions of soybean root nodules. J. Gen. Microbiol. 22, 671 - 677 (1960).

BERGERSEN, F.J.: The effects of partial pressure of oxygen upon respiration and nitrogen fixation by soybean root nodules. J. Gen. Microbiol. 29, 113 - 125 (1962).

BERGERSEN, F.J.: Ammonia - an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodules. Aust. J. Biol. Sci. 18, 1 - 9 (1965).

BERGERSEN, F.J.: The quantitative relationship between nitrogen fixation and acetylene-reduction assay. Aust.J. Biol. Sci. 23, 1015 - 1025 (1970).

BERGERSEN, F.J.: Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 121 - 140 (1971).

BERGERSEN, F.J.: Formation and function of bacteroids. In: The biology of nitrogen fixation (Quispel, A.,ed.), 473 - 498, North Holland Publ., Amsterdam (1974).

BERGERSEN, F.J. and D.J. GOODCHILD: Aeration pathways in soybean root nodules. Aust. J. Biol. Sci. 26, 729 - 740 (1973a).

BERGERSEN, F.J. and D.J. GOODCHILD: Cellular location and concentration of leghaemoglobin in soybean root nodules. Aust. J. Biol. Sci. 26, 741 - 756 (1973 b).

BERGERSEN, F.J. and G.L. TURNER: The role of O_2-limitation in control of nitrogenase in continuous cultures of Rhizobium sp. Biochem. Biophys. Res. Comm. 73, 524 - 531 (1976).

BERGERSEN, F.J., G.L. TURNER and C.A. APPLEBY: Studies of the physiological role of leghaemoglobin in soybean root nodules. Biochim. Biophys. Acta 292, 271 - 282 (1973).

BERGMEYER, H.-U. und E. BERNT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase. In: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.-U., Hrsg.), 846 - 853, Verlag Chemie, Weinheim (1962).

BISHOP, P.E., J.G. GUEVARA, J.A. ENGELKE and H.J. EVANS: Relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between Rhizobium japonicum and Glycine max. Plant Physiol. 57, 542 - 546 (1976).

BOCTOR, F.N.: Hematin interference with Lowry protein determination. Anal. Biochem. 50, 500 - 502 (1972).

BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248 - 254 (1976).

BROUGHTON, W.J. and M.J. DILWORTH: Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. Biochem. J. 125, 1075 - 1080 (1971).

BROUGHTON, W.J., M.J. DILWORTH and C.A. GODFREY: Molecular properties of lupin and serradella leghaemoglobins. Biochem. J. 127, 309 - 314 (1972).

BROUGHTON, W.J., C.H. HOH, C.A. BEHM and H.F. TUNG: Development of the nitrogen fixing apparatus in the legumes, Centrosema pubescens Benth., and Vigna unguiculata L. Walp. Planta 139, 183 - 192 (1978).

BROWN, C.M. and M.J. DILWORTH: Ammonia assimilation by Rhizobium cultures and bacteroids. J. Gen. Microbiol. 86, 39 - 48 (1975).

BUNCE, J.A.: Effects of water stress on leaf expansion, net photosynthesis, and vegetative growth of soybean and cotton. Can. J. Bot. 56, 1492 - 1498 (1978).

BURNS, R.C. and R.W.F. HARDY: Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1975.

BURRIS, R.H.: Preparation and properties of nitrogenase proteins. In: Nitrogen fixation by free-living micro-organisms, IBP 6 (Stewart, W.D.P., ed.), 333 - 349, Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne (1975).

CALDWELL, B.E. and H.G. VEST: Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: the macrosymbiont. In: A treatise on dinitrogen fixation, Section III: Biology (Hardy, R.W.F. and W.S. Silver, eds.), 557 - 576, J. Wiley and Sons, New York, London, Sydney, Toronto (1977).

CALVERT, H.E., M. LALONDE, T.V. BHUVANESWARI and W.D. BAUER: Role of lectins in plant-microorganism interactions. IV. Ultrastructural localization of soybean lectin binding sites on Rhizobium japonicum. Can. J. Microbiol. 24, 785 - 793 (1978).

CHEN, H.K. and H.G. THORNTON: The structure of 'ineffective' nodules and its influence on nitrogen fixation. Proc. Royal Soc. London, Ser. B - Biol. Sci. 129, 208 - 229 (1940)

CHILD, J.J.: Nitrogen fixation by a Rhizobium sp. in association with non-leguminous plant cell cultures. Nature 253, 350 - 351 (1975).

CORBY, H.D.L.: The shape of leguminous nodules and the colour of leguminous roots. Plant and Soil, Spec. Vol., 305 - 314 (1971).

COVENTRY, D.R., M.J. TRINICK and C.A. APPLEBY: A search for a leg-haemoglobin-like compound in root nodules of Trema cannabina Lour. Biochim. Biophys. Acta 420, 105 - 111 (1976).

CUTTING, J.A. and H.M. SCHULMAN: The site of heme synthesis in soybean root nodules. Biochim. Biophys. Acta 192, 486 - 493 (1969).

CUTTING, J.A. and H.M. SCHULMAN: The biogenesis of leghemoglobin. The determinant in the Rhizobium - legume symbiosis for leg-hemoglobin specifity. Biochim. Biophys. Acta 229, 58 - 62 (1971).

DARROW, R.A. and R.R. KNOTTS: Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. Biochem. Biophys. Res. Comm. 78, 554 - 559 (1977).

DARROW, R.A. and R.R. KNOTTS: Contrasting physical properties of glutamine synthetases I and II from Rhizobium japonicum 61-A-76 (Abstr.). Proceedings of the Steenbock-Kettering Intern. Symp. on Nitrogen Fixation, Madison, Wisconsin, p. 48 (1978).

DART, P.: Infection and development of leguminous nodules. In: A treatise on dinitrogen fixation, Section III: Biology (Hardy, R.W.F. and W.S. Silver, eds.), 367 - 472, J. Wiley and Sons, New York, London, Sydney, Toronto (1977).

DATE, R.A.: Principles of Rhizobium strain selection. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants, IBP 7 (Nutman, P.S., ed.), 137 - 150, Cambridge University Press, London, New York, Melbourne (1976).

DE DUVE, C.: A spectrophotometric method for the simultaneous determination of myoglobin and hemoglobin in extracts of human muscle. Acta Chem. Scand. 2, 264 - 289 (1948).

DERBYSHIRE, E., D.J. WRIGHT and D. BOULTER: Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochem. 15, 3 - 24 (1976).

DHARMAWARDENE, M.W.N. and W.D.P. STEWART: Nitrogenase activity, amino acid pool patterns and amination in blue-green algae. Planta 108, 133 - 145 (1972).

DILWORTH, M.J.: The plant as the genetic determinant of leghaemoglobin production in the legume root nodule. Biochim. Biophys. Acta 184, 432 - 441 (1969).

DILWORTH, M.J. and D.K. KIDBY: Localization of iron and leghaemoglobin in the legume root nodule by electron microscope autoradiography. Exp. Cell Res. 49, 148 - 159 (1968).

DILWORTH, M.J. and D.C. WILLIAMS: Nucleic acid changes in bacteroids of Rhizobium lupini during nodule development. J. Gen. Microbiol. 48, 31 - 36 (1967).

DIXON, R.O.D.: Rhizobia (with particular reference to relationships with host plants). Ann. Rev. Microbiol. 23, 137 - 157 (1969).

DUNN, S.D. and R.V. KLUCAS: Studies on possible routes of ammonium assimilation in soybean root nodule bacteroids. Can. J. Microbiol. 19, 1493 - 1499 (1973).

EADY, R.R. and J.R. POSTGATE: Nitrogenase. Nature 249, 805 - 810 (1974).

ELLIOTT, W.H.: Glutamine synthesis. In: Methods in Enzymology II (Collowick, S.P. and N.O. Kaplan, eds.), 337 - 342, Academic Press Inc., Publ. New York (1955).

EVANS, H.J. and S.A. RUSSEL: Physiological chemistry of symbiotic nitrogen fixation by legumes. In: Chemistry and biochemistry of nitrogen fixation (Postgate, J.R., ed.) 191 - 245, Plenum Press, London, New York (1971).

FALK, J.E., C.A. APPLEBY and R.J. PORRA: The nature, function and biosynthesis of the haem compounds and porphyrins of legume root nodules. In: Utilization of nitrogen and its compounds by plants (Porter, K.H., ed.), 73 - 86, University Press, Cambridge (1959).

FAWCETT, D.W.: An atlas of fine structure, the cell, its organelles and inclusions. Saunders, Philadelphia, London 1966.

FAZEKAS DE ST. GROTH, S., R.G. WEBSTER and A. DATYNER: Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. Biochim. Biophys. Acta 71, 377 - 391 (1963).

FOTTRELL, P.F. and H. GRIMES: Dehydrogenases and aminotransferases in legume root nodules. 9th International Congress for Microbiology, Moscow, Abstr. Pap. 285 (1966).

FUCHS, R.L. and D.L. KEISTER: Effect of oxygen concentration on glutamine synthetase I and II in Rhizobium japonicum 3I1b83 (Abstr.). Proceedings of the Steenbock-Kettering Intern. Symp. on Nitrogen Fixation, Madison, Wisconsin, p. 9 (1978).

GEIGER, P.J. and S.P. BESSMAN: Protein determination by Lowry's method in the presence of sulfhydryl reagents. Anal. Biochem. 49, 467 - 473 (1972).

GERSON, T., J.J. PATEL and M.N. WONG: The effects of age, darkness and nitrate on poly-ß-hydroxybutyrate levels and nitrogen-fixing ability of Rhizobium in Lupinus angustifolius. Physiol. Plant. 42, 420 - 424 (1978).

GINSBURG, A. and E.R. STADTMAN: Regulation of glutamine synthetase in Escherichia coli. In: The enzymes of glutamine metabolism (Prusiner, S. and E.R. Stadtman, eds.), 9 - 43, Academic Press Inc., New York, London (1973).

GODREY, C.A., D.R. COVENTRY and M.J. DILWORTH: Some aspects of leghaemoglobin biosynthesis. In: Nitrogen fixation by free-living micro-organisms, IBP 6 (Stewart, W.D.P., ed.),311 - 332, Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne (1975).

GOOD, N.E., D. WINGET, W. WINTER, T.N. CONNOLLY, S. IZAWA and R.M.M. SINGH: Hydrogen ion buffers for biological research. Biochem. 5, 467 - 477 (1966).

GOODCHILD, D.J. and F.J. BERGERSEN: Electron microscopy of the infection and subsequent development of soybean nodule cells. J. Bacteriol. 92, 204 - 213 (1966).

GRIMES, H. and C.L. MASTERSON: Isoenzyme patterns of nodules from specific legume - Rhizobium combinations. Plant and Soil 35, 289 - 297 (1971).

GRIMES, H. and S. TURNER: Qualitative and quantitative studies of some enzymes in the nodule, root and shoot of Pisum sativum. Plant and Soil 35, 269 - 273 (1971).

HAISSIG, B.E. and A.L. SCHIPPER, Jr.: Effect of sequestering and reducing agents on stabilization of plant dehydrogenase activity in crude extracts. Phytochem. 14, 345 - 349 (1975).

HARBORNE, J.B. and N.W. SIMMONDS: The natural distribution of the phenolic aglycones. In: Biochemistry of phenolic compounds (Harborne, J.B., ed.), 77 - 127, Academic Press, London (1964).

HARDY, R.W.F., R.C. BURNS, R.R. HEBERT, R.D. HOLSTEN and E.K. JACKSON: Biological nitrogen fixation: a key to world protein. Plant and Soil, Spec. Vol., 561 - 590 (1971).

HARDY, R.W.F. and U.D. HAVELKA: Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants, IBP 7 (Nutman, P.S., ed.), 421 - 439, Cambridge University Press, London, New York, Melbourne (1976).

HARDY, R.W.F., R.D. HOLSTEN, E.K. JACKSON and R.C. BURNS: The acetylene - ethylene assay for N_2-fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol. 43, 1185 - 1207 (1968).

HENDRIX, D.L. and R.M. KENNEDY: Adenosine triphosphatase from soybean callus and root cells. Plant Physiol. 59, 264 - 267 (1977).

HERBERT, D., P.J. PHIPPS and R.E. STRANGE: Chemical analysis of microbial cells. In: Methods in Microbiol., Vol. 5B (Norris, J.R. and D.W. Ribbons, eds.), 209 - 344, Academic Press Inc., New York (1971).

HIGUCHI, M. and F. YOSHIDA: Lowry determination of protein in the presence of sulfhydryl compounds or other reducing agents. Anal. Biochem. 77, 542 - 547 (1977).

HUBBARD, J.S. and E.R. STADTMAN: Regulation of glutamine synthetase. II. Patterns of feedback inhibition in microorganisms. J. Bact. 93, 1045 - 1055 (1967).

HUBBEL, D.H.: Studies on the root hair "curling factor" of Rhizobium. Bot. Gaz. 131, 337 - 342 (1970).

JOHNSON, H.S. and D.J. HUME: Comparisons of nitrogen fixation estimates in soybeans by nodule weight, leghemoglobin content, and acetylene reduction. Can. J. Microbiol. 19, 1165 - 1168 (1973).

JOHNSON, H.W. and R.L. BERNARD: Soybean genetics and breeding. In: The soybean (Norman, A.G., ed.), 1 - 73, Academic Press, New York, London (1963).

KEISTER, D.L.: Acetylene reduction by pure cultures of rhizobia. J. Bact. 123, 1265 - 1268 (1975).

KENNEDY, I.R.: Primary products of symbiotic nitrogen fixation. I. Short-term exposures of serradella nodules to $^{15}N_2$. Biochem. Biophys. Acta 130, 285 - 294 (1966 a).

KENNEDY, I.R.: Primary products of symbiotic nitrogen fixation. II. Pulse-labelling of serradella nodules with $^{15}N_2$. Biochem. Biophys. Acta 130, 295 - 303 (1966b).

KHANNA, S.K., R.L. MATTOO, P.N. VISWANATHAN, C.P. TEWARI and G.G. SANWAL: Colorimetric determination of protein and orthophosphate in plant tissues rich in phenolics. Ind. J. Biochem. 6, 21 - 25 (1969).

KLUCAS, R.V.: Studies on soybean nodule senescence. Plant Physiol. 54, 612 - 616 (1974).

KLUCAS, R.V. and H.J. EVANS: An electron donor system for nitrogenase-dependent acetylene reduction by extracts of soybean nodules. Plant Physiol. 43, 1458 - 1460 (1968).

KLÜVER, H.: On a possible use of the root nodules of leguminous plants for research in neurology and psychiatry (preliminary report on a free porphyrin-hemoglobin system). J. Psychol. 25, 331 - 356 (1948).

KOCH, B. and H.J. EVANS: Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. Plant Physiol. 41, 1748 - 1750 (1966).

KONDOROSI, A., Z. SVAB, G.B. KISS and R.A. DIXON: Ammonia assimilation and nitrogen fixation in Rhizobium meliloti. Molec. Gen. Genet. 151, 221 - 226 (1977).

KRETOVICH, W.L., Z.G. EVSTIGNEEVA, K.B. ASEEVA, O.N. ZARGARYAN and E.M. MARTYNOVA: Activity of certain enzymes in lupin nodule fractions. Dokl. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol. 186, 1198 - 1201 (1969).

KRETOVICH, W.L., V.I. ROMANOV, L.A. YUSHKOVA, V.I. SHRAMKO and N.G. FEDULOVA: Nitrogen fixation and poly-ß-hydroxybutyric acid content in bacteroids of Rhizobium lupini and Rhizobium leguminosarum. Plant and Soil 48, 291 - 302 (1977).

KURZ, W.G.W. and T.A. LARUE: Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. Nature 256, 407 - 409 (1975).

KURZ, W.G.W., D.A. ROKOSH and T.A. LARUE: Enzymes of ammonia assimilation in Rhizobium leguminosarum bacteroids. Can. J. Microbiol. 21, 1009 - 1012 (1975).

KUYKENDALL, L.D. and G.H. ELKAN: Rhizobium japonicum derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization. Appl. Env. Microbiol. 32, 511 - 519 (1976).

LARUE, T.A.G. and W.G.W. KURZ: Estimation of nitrogenase in intact legumes. Can. J. Microbiol. 19, 304 - 305 (1973).

LAWN, R.J. and W.A. BRUN: Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source-sink manipulations. Crop Science 14, 11 - 16 (1974).

LAWRIE, A.C. and C.T. WHEELER: The supply of photosynthetic assimilates to nodules of Pisum sativum L. in relation to the fixation of nitrogen. New Phytol. 72, 1341 - 1348 (1973).

LAWRIE, A.C. and C.T. WHEELER: The effects of flowering and fruit formation on the supply of photosynthetic assimilates to the nodules of Pisum sativum L. in relation to the fixation of nitrogen. New Phytol. 73, 1119 - 1127 (1974).

LAWRIE, A.C. and C.T. WHEELER: Nitrogen fixation in the root nodules of Vicia faba L. in relation to the assimilation of carbon. I. Plant growth and metabolism of photosynthetic assimilates. New Phytol. 74, 429 - 436 (1975).

LJONES, T.: The enzyme system. In: The biology of nitrogen fixation (Quispel, A., ed.), 617 - 637, North Holland Publ., Amsterdam (1974).

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951).

LUDWIG, R.A.: Control of nitrogen fixation and ammonium assimilation in Rhizobium 32 H 1 (Abstr.). Proceedings of the Steenbock-Kettering Intern. Symp. on Nitrogen Fixation, Madison, Wisconsin, p. 44 (1978).

LUDWIG, R.A. and E.R. SIGNER: Glutamine synthetase and control of nitrogen fixation in Rhizobium. Nature 267, 245 - 248 (1977).

MAC NICOL, P.K.: Synthesis and interconversion of amino acids in developing cotyledons of pea (Pisum sativum L.). Plant Physiol. 60, 344 - 348 (1977).

MAGUE, T.H. and R.H. BURRIS: Reduction of acetylene and nitrogen by field-grown soybeans. Nes Phytol. 71, 275 - 286 (1972).

MANDELSTAM, J.: Recurring patterns during development in primitive organisms. In: Control mechanisms of growth and differentiation, Symposia Soc. exp. Biology 25 (Davies, D.D. and M. Balls, eds.), 1 - 26, Cambridge (1971).

MARTINEZ, C.J., J.H. TORRIE and O.N. ALLEN: Correlation analysis of criteria of symbiotic nitrogen fixation by soybeans (Glycine max Merr.). Zbl. Bakt., II. Abt. 124, 212 - 216 (1970).

MC COMB, J.A., J. ELLIOTT, M.J. DILWORTH: Acetylene reduction by Rhizobium in pure culture. Nature 256, 409 - 410 (1975).

MC PARLAND, R.H., J.G. GUEVARA, R.K. BECKER and H.J. EVANS: The purification and properties of the glutamine synthetase from the cytosol of soya-bean root nodules. Biochem. J. 153, 597 - 606 (1976).

MEEKS, J.C., C.P. WOLK, N. SCHILLING, P. SHAFFER, Y. AVISSAR and W.-S. CHIEN: Initial organic products of fixation of $[^{13}N]$ dinitrogen by root nodules of soybean (Glycine max). Plant Physiol. 61, 980 - 983 (1978).

MIFLIN, B.J. and P.J. LEA: Amino acid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 299 - 329 (1977).

MINCHIN, F.R. and J.S. PATE: The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. J. Exp. Bot. 24, 259 - 271 (1973).

MONAR, I.: Analysenautomat zur simultanen Mikrobestimmung von C, H und N. Mikrochimica Acta (Wien), 784 - 806 (1972).

Monthly Bulletin of Statistics; United Nations, New York 32 (9), XII (1978).

MULDER, E.G., K. BAKEMA and W.L. VAN VEEN: Molybdenum in symbiotic nitrogen fixation and in nitrate assimilation. Plant and Soil 10, 319 - 334 (1959).

NAGATANI, H., M. SHIMIZU and R.C. VALENTINE: The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria. Arch. Mikrobiol. 79, 164 - 175 (1971).

NASH, D.T. and H.M. SCHULMAN: Leghemoglobins and nitrogenase activity during soybean root nodule development. Can. J. Bot. 54, 2790 - 2797 (1976).

NEWCOMB, W., K. SYONO and J.G. TORREY: Development of an ineffective pea root nodule: morphogenesis, fine structure, and cytokinin biosynthesis. Can. J. Bot. 55, 1891 - 1907 (1977).

NUTMAN, P.S.: Sources of incompatibility affecting nitrogen fixation in legume symbiosis. In: Utilization of nitrogen and its compounds by plants (Porter, K.H., ed.), 42 - 58, University Press, Cambridge (1959).

O'GARA, F. and K.T. SHANMUGAM: Regulation of nitrogen fixation by rhizobia. Export of fixed N_2 as NH_4^+. Biochim. Biophys. Acta 437, 313 - 321 (1976).

PAGAN, J.D., J.J. CHILD, W.R. SCOWCROFT and A.H. GIBSON: Nitrogen fixation by Rhizobium cultured on a defined medium. Nature 256, 406 - 407 (1975).

PANKHURST, C.E. and J.I. SPRENT: Surface features of soybean root nodules. Protoplasma 85, 85 - 98 (1975 a).

PANKHURST, C.E. and J.I. SPRENT: Effects of water stress on the respiratory and nitrogen-fixing activity of soybean root nodules. J. Exp. Bot. 26, 287 - 304 (1975 b).

PATE, J.S.: Physiology of the reaction of nodulated legumes to environment. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants (Nutman, P.S., ed.), 335 - 360, Cambridge University Press, London, New York, Melbourne (1976).

PAUL, K.G., H. THEORELL and Å. ÅKESON: The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen). Acta Chem. Scand. 7, 1284 - 1287 (1953).

PIERCE, J. and C.H. SUELTER: An evaluation of the Coomassie Brillant Blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination. Anal. Biochem. 81, 478 - 480 (1977).

PLANQUE, K., I.R. KENNEDY, G.E. DE VRIES, A. QUISPEL and A.A.N. VAN BRUSSEL: Location of nitrogenase and ammonia-assimilatory enzymes in bacteroids of Rhizobium leguminosarum and Rhizobium lupini. J. Gen. Microbiol. 102, 95 - 104 (1977).

PLANQUE, K., G.E. DE VRIES and J.W. KIJNE: The relationship between nitrogenase and glutamine synthetase in bacteroids of Rhizobium leguminosarum of various ages. J. Gen. Microbiol. 106, 173 - 178 (1978).

POLLARD, H.B., R. MENARD, H.A. BRANDT, C.J. PAZOLES, C.E. CREUTZ and A. RAMU: Application of Bradford's protein assay to adrenal gland subcellular fractions. Anal. Biochem. 86, 761 - 763 (1978).

POSTGATE, J.R.: Consequences of the transfer of nitrogen fixation genes to new hosts. AMBIO 6, 178 - 180 (1977).

POTTY, V.H.: Determination of proteins in the presence of phenols and pectins. Anal. Biochem. 29, 535 - 539 (1969).

QUEBEDEAUX, B. and R.W.F. HARDY: Reproductive growth and dry matter production of Glycine max (L.) Merr. in response to oxygen concentration. Plant Physiol. 55, 102 - 107 (1975).

QUEBEDEAUX, B., U.D. HAVELKA, K.L. LIVAK and R.W.F. HARDY: Effect of altered pO_2 in the aerial part of soybean on symbiotic N_2 fixation. Plant Physiol. 56, 761 - 764 (1975).

QUISPEL, A.: Regulations- und Entwicklungs-Probleme der symbiontischen Stickstoffixierung. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 90, 397 - 410 (1977).

RAO, V.R., R.A. DARROW and D.L. KEISTER: Effect of oxygen tension on nitrogenase and on glutamine synthetase I and II in Rhizobium japonicum 61-A-76. Biochem. Biophys. Res. Comm. 81, 224 - 231 (1978).

ROBERTSON, J.G., M.P. WARBURTON and K.J.F. FARNDEN: Induction of glutamate synthase during nodule development in lupin. FEBS Letters 55, 33 - 37 (1975 a).

ROBERTSON, J.G., K.J.F. FARNDEN, M.P. WARBURTON and J.M. BANKS: Induction of glutamine synthetase during nodule development in lupin. Aust. J. Plant Physiol. 2, 265 - 272 (1975 b).

ROMANOV, V.I., L.A. YUSHKOVA and W.L. KRETOVICH: Synthesis and decomposition of poly-ß-hydroxybutyric acid in Rhizobium lupini. Mikrobiologija 44, 820 - 824 (1975).

ROWELL, P. and W.D.P. STEWART: Alanin dehydrogenase of the N_2-fixing blue-green alga, Anabaena cylindrica. Arch. Microbiol. 107, 115 - 124 (1976).

RYAN, E. and P.E. FOTTRELL: Subcellular localization of enzymes involved in the assimilation of ammonia by soybean root nodules. Phytochem. 13, 2647 - 2652 (1974).

SCHWINGHAMER, E.A.: Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: the microsymbiont. In: A treatise on dinitrogen fixation, Section III: Biology (Hardy, R.W.F. and WS. Silver, eds.), 577 - 622, J. Wiley and Sons, New York, London, Sydney, Toronto (1977).

SCOWCROFT, W.R. and A.H. GIBSON: Nitrogen fixation by Rhizobium associated with tobacco and cowpea cell cultures. Nature 253, 351 - 352 (1975).

SCOWCROFT, W.R., A.H. GIBSON and J.D. PAGAN: Nitrogen fixation in cultured cowpea rhizobia: inhibition and regulation of nitrogenase activity. Biochem. Biophys. Res. Comm. 73, 516 - 523 (1976).

SEDMAK, J.J. and S.E. GROSSBERG: A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brillant Blue G 250. Anal. Biochem. 79, 544 - 552 (1977).

SEPASKHAH, A.R.: Effects of soil salinity levels and plant water stress at various soybean growth stages. Can. J. Plant Sci. 57, 925 - 927 (1977).

SHAPIRO, B.M. and E.R. STADTMAN: Glutamine synthetase (Escherichia coli). In: Methods in Enzymology XVII A (Collowick, S.P. and N.O. Kaplan, eds.), 910 - 922, Academic Press Inc., Publ. New York (1970).

SHAPOSHNIKOV, G.L., K.B. ASCEVA and Z.G. EVSTIGNEEVA: Changes of protein and free amino acid content in bacteroids of Rhizobium lupini in the vegetative cycle. Fiziologiya Rastenii 23, 620 - 622 (1976).

SLOGER, C.: Symbiotic effectiveness and N_2 fixation in nodulated soybean. Plant Physiol. 44, 1666 - 1668 (1969).

SLOGER, C.: Assimilation of ammonia by glutamine synthetase and glutamate synthetase in N_2-fixing bacteroids from soybean nodules. Plant Physiol. 51, 34 S (1973).

SLOGER, C., D. BEZDICEK, R. MILBERG and N. BOONKERD: Seasonal and diurnal variations in N_2 (C_2H_2) -fixing activity in field soybeans. In: Nitrogen fixation by free-living micro-organisms, IBP 6 (Stewart, W.D.P., ed.), 271 - 284, Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne (1975).

SMITH, J.D.: The concentration and distribution of haemoglobin in the root nodules of leguminous plants. Acta Chem. Scand. 44, 585 - 591 (1949).

SMITH, K.M. (ed.): Porphyrins and metalloporphyrins. Elsevier Scientific Publ. Comp. Amsterdam, New York, Oxford 1975.

SOLECKA, M., J.A. ROSS and D.F. MILLIKAN: Evidence of substances interfering with the Lowry test for protein in plant leaf tissue. Phytochem. 7, 1293 - 1295 (1968).

SPECTOR, T.: Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantitation. Anal. Biochem. 86, 142 - 146 (1978).

SPRENT, J.I.: The effect of water stress on nitrogen-fixing root nodules. I. Effects on the physiology of detached soybean nodules. New Phytol. 70, 9 - 17 (1971 a).

SPRENT, J.I.: Effects of water stress on nitrogen fixation in root nodules. Plant and Soil, Spec. Vol., 225 - 228 (1971 b).

SPRENT, J.I.: Nitrogen fixation by legumes subjected to water and light stresses. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants (Nutman, P.S., ed.), 405 - 420, Cambridge University Press, London, New York, Melbourne (1976).

STEWART, W.D.P., H. HAYSTEAD and M.W.N. DHARMAWARDENE: Nitrogen assimilation and metabolism in blue-green algae. In: Nitrogen fixation by free-living microorganisms, IBP 6 (Stewart, W.D.P., ed.). 129 - 158, Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne (1975).

STOREY, R. and M. REPORTER: Amino acid metabolism in developing soybeans (Glycine max): glutamate synthase in the cotyledons. Can. J. Bot. 56, 1349 - 1356 (1978).

STREICHER, S.L., K.T. SHANMUGAM, F. ASUBEL, C. MORANDI and R.B. GOLDBERG: Regulation of nitrogen fixation in K. pneumoniae: evidence for a role of glutamine synthetase as a regulator of nitrogenase synthesis. J. Bact. 129, 815 - 821 (1974).

STRIPF, R. und D. WERNER: Untersuchungen über die spezifischen Aktivitäten zweier Enzyme des N-Stoffwechsels der Symbiose von Glycine max und Rhizobium japonicum in Gewebekultursystemen und Knöllchen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 89, 575 - 586 (1976).

Technical Bulletin 1051 E. Bio Rad Laboratories, April 1977.

TJEPKEMA, J. and H.J. EVANS: Nitrogen fixation by free-living Rhizobium in a defined liquid medium. Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 625 - 628 (1975).

TJEPKEMA, J.D. and C.S. YOCUM: Leghaemoglobin facilitated oxygen diffusion in soybean nodule slices. Plant Physiol. 46 (Suppl.), 44 (1970).

TRINICK, M.J., M.J. DILWORTH and M. GROUNDS: Factors affecting the reduction of acetylene by root nodules of Lupinus species. New Phytol. 77, 359 - 370 (1976).

TRUCHET, G.: Mise en evidence de l`activite peroxydasique dans les differentes zones des nodules radiculaires de pois (Pisum sativum L.). Localisation de la leghemoglobine. C.R. Acad. Sci. Paris 274, 1290 - 1293 (1972).

TSIEN, H.C. and E.L. SCHMIDT: Polarity in the exponential-phase Rhizobium japonicum cell. Can. J. Microbiol. 23, 1274 - 1284 (1977).

TUBB, R.S.: Glutamine synthetase and ammonium regulation of nitrogenase synthesis in Klebsiella. Nature 251, 481 - 485 (1974).

TUBB, R.S. and J.R. POSTGATE: Control of nitrogenase synthesis in Klebsiella pneumoniae. J. Gen. Microbiol. 79, 103 - 119 (1973).

UPCHURCH, R.G. and G.H. ELKAN: Ammonia assimilation in Rhizobium japonicum colonial derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency. J. Gen. Microbiol. 104, 219 - 225 (1978).

VALLEJO, C.G. and R. LAGUNAS: Interferences by sulfhydryl, disulfide reagents and potassium ions on protein determination by Lowry's method. Anal. Biochem. 36, 207 - 212 (1970).

VAN BRUSSEL, A.A.N.: The cell wall of bacteroids of Rhizobium leguminosarum Frank. Habilitationsschrift, Leiden 1973.

VAN KLEY, H. and S.M. HALE: Assay for protein by dye binding. Anal. Biochem. 81, 485 - 487 (1977).

VINCENT, J.M.: Root-nodule symbiosis with Rhizobium. In: The biology of nitrogen fixation (Quispel, A., ed.), 266 - 332, North Holland Publ., Amsterdam (1974).

VIRTANEN, A.J. and J.K. MIETTINNEN: Formation of biliverdin from legcholeglobin, the green pigment in leguminous root nodules. Acta Chem. Scand. 3, 17 - 21 (1949).

WEBER, D.F., B.E. CALDWELL, C. SLOGER and H.G. VEST: Some USDA studies on the soybean-Rhizobium symbiosis. Plant and Soil, Spec. Vol., 293 - 304 (1971).

WEISSMANN, G.S.: Influence of ammonium and nitrate nutrition on enzymatic activity in soybean and sunflower, Plant Physiol. 49, 138 - 141 (1972).

WERNER, D.: Symbiontische und semisymbiontische Stickstoff-Fixierung. Naturw. Rundschau 27, 177 - 182 (1974).

WERNER, D.: Nitrogenase-activity in the in vitro symbiosis of Rhizobium japonicum and tissue cultures of Glycine max and in Rhizobium in pure culture on defined media. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 89, 563 - 574 (1976).

WERNER, D. and K. BERGHÄUSER: Discrimination of Rhizobium japonicum, Rhizobium lupini, Rhizobium leguminosarum and Rhizobium trifolii and of bacteroids by uptake of 2-ketoglutaric acid, glutamic acid and phosphate. Arch. Microbiol. 107, 257 - 262 (1976).

WERNER, D. and D. GOGOLIN: Kennzeichnung der Bildung und Alterung von Wurzeln in Callus- und Organ-Kulturen von Daucus carota durch die Aktivität der Glutamatdehydrogenase. Planta 91, 155 - 164 (1970).

WERNER, D. and E. MÖRSCHEL: Differentiation of nodules of Glycine max. I. Ultrastructural studies of plant cells and bacteroids. Planta 141, 169 - 177 (1978).

WERNER, D. and R. STRIPF: Differentiation of Rhizobium japonicum, I. Enzymatic comparison of nitrogenase repressed and derepressed free living cells and of bacteroids. Z. Naturforsch. 33c, 245 - 252 (1978).

WERNER, D., J. WILCOCKSON and E. ZIMMERMANN: Adsorption and selection of rhizobia with ion-exchange papers. Arch. Microbiol. 105, 27 - 32 (1975).

WIGHTMAN, F. and J.C. FOREST: Properties of plant aminotransferases. Phytochem. 17, 1455 - 1471 (1978).

WILCOCKSON, J. and D. WERNER: Nitrogenase activity by Klebsiella and Rhizobium on solid substrata exposed to air. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 89, 587 - 607 (1976).

WITTENBERG, J.B., F.J. BERGERSEN, C.A. APPLEBY and G.L. TURNER: Facilitated oxygen diffusion. The role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. J. Biol. Chem. 249, 4057 - 4066 (1974).

WONG, P.P. and H.J. EVANS: Poly-ß-hydroxybutyrate utilization by soybean (Glycine max Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. Plant Physiol. 47, 750 - 755 (1971).

WONG, P., H.J. EVANS, R. KLUCAS and S. RUSSELL: Investigations into the pathway of electron transport to the nitrogenase from nodule bacteroids. Plant and Soil, Spec. Vol., 525 - 543 (1971).

WU,H.: A new colorimetric method for the determination of plasma proteins. J. Biol. Chem. 51, 33 - 39 (1922).

ZELITCH, P.W.W. and R.H. BURRIS: The amino acid composition and distribution of N^{15} in soybean root nodules supplied N^{15}-enriched N_2. Plant Physiol. 27, 1 - 8 (1952).

ANHANG

Elektronenmikroskopische Abbildungen

Abb. I: Medianer Schnitt durch die Bakteroiden-Zone eines Knöllchens von Glycine max var. Caloria 11 Tage nach der Infektion mit Rhizobium japonicum 3I1b85 (effektiv): Bakteroiden (B) in Infektionsvakuolen; Zellkern (K); Plastiden (P) mit Stärke; x 9400.

Abb. II: Schnitt wie in Abb. I: Dictyosomen (D); Endoplasmatisches Reticulum (ER); hervorstehender Teil der Membranhülle (MH); x 21500.

Abb. III: Teil einer Zelle 15 Tage nach der Infektion (effektiv): Infektionsfaden (IF); rauhes Endoplasmatisches Reticulum (ER); x 23300.

Abb. IV: Schnitt wie in Abb. III: Große Mitochondrien (M) um Plastiden (P) mit Stärke; x 19700.

Abb. V: Infizierte und nichtinfizierte Zellen 20 Tage nach der Infektion (effektiv); x 4050.

Abb. VI: Schnitt wie in Abb. V: Poly-ß-Hydroxybuttersäure (PHBS) an beiden Enden der Bakteroiden; Bakterienkern (Nucleoid N); Polyphosphat (PP); x 54000.

Abb. VII: Schnitt durch ein 29 Tage altes Knöllchen (effektiv) mit großem Mitochondrium (M), welches einem Plastid (P) eng anliegt; pflanzliche Zellwand (ZW); x 40500.

Abb. VIII: Teil einer Zelle 35 Tage nach der Infektion (effektiv): Zellkern (K) mit unregelmäßiger Form; Bakteroiden mit Poly-ß-Hydroxybuttersäure gefüllt; x 13000.

Abb. IX: Medianer Schnitt durch die Bakteroiden-Zone eines Knöllchens von Glycine max var. Caloria 15 Tage nach der Infektion mit Rhizobium japonicum 61-A-24 (ineffektiv): Bakteroiden (B) in Infektionsvakuolen; Zellkern (K); Plastid (P) mit Stärke; Infektionsfaden (IF); x 9400.

Abb. X: Teil einer Zelle 15 Tage nach der Infektion (ineffektiv): Zellkern (K); Plastid (P) mit Stärke; Mitochondrien (M); x 18500.

Abb. XI: Teil einer Zelle 15 Tage nach der Infektion (ineffektiv): Bakterienzelle (B), die sich innerhalb der Infektionsvakuole teilt; Dictyosom (D); pflanzliche Zellwand (ZW); x 32000.

Abb. XII: Schnitt wie in Abb. XI: Bakterium mit vergrößerter Infektionsvakuole (IV); x 44300.

Abb.XIII: Teil einer degenerierenden infizierten Zelle 21 Tage nach der Infektion (ineffektiv): Reste des pflanzlichen Cytoplasmas (PC); Symbionten ohne Infektionsvakuole; Polyphosphat (PP); Poly-ß-Hydroxybuttersäure (PHBS); x 18500.

Abb. XIV: Nichtinfizierte Zelle (die von infizierten Zellen umgeben ist) 21 Tage nach der Infektion (ineffektiv): große Stärkekörner (S); Zellkern (K); x 9700.

Abb. XV: Infizierte Zelle 25 Tage nach der Infektion (ineffektiv). Links oben: Teil einer Stärke enthaltenden lebensfähigen nichtinfizierten Zelle; x 13800.

Durch den Fotodruck wurden die Vorlagen auf 70 % verkleinert.
Entsprechend sind auch die Vergrößerungsangaben zu reduzieren.

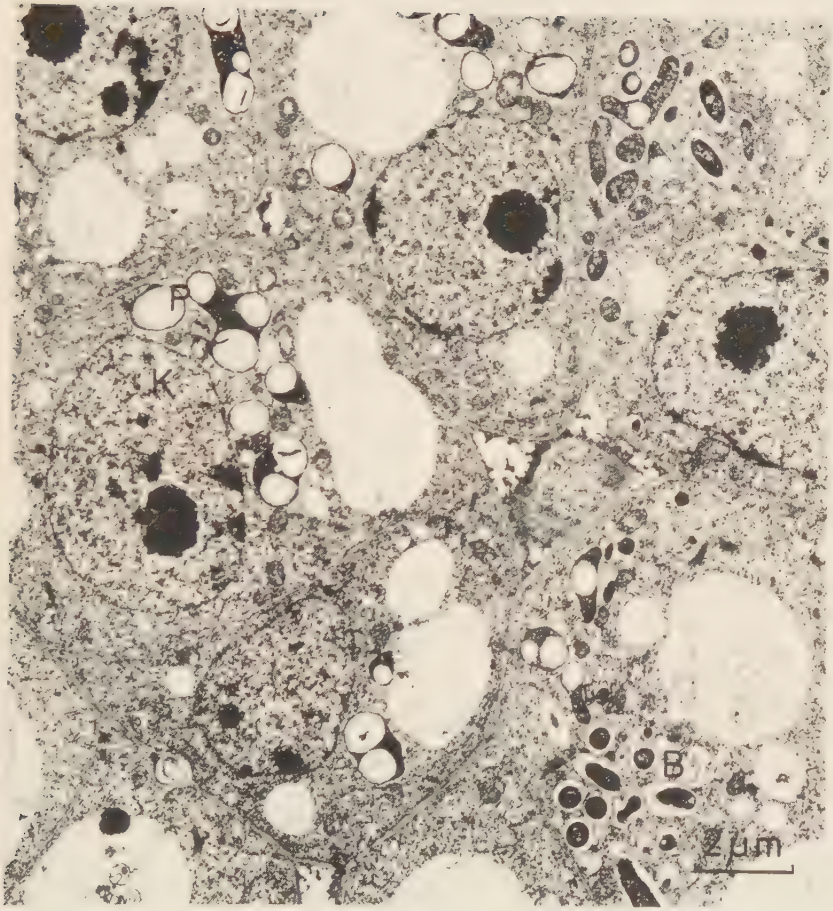


Abb. I

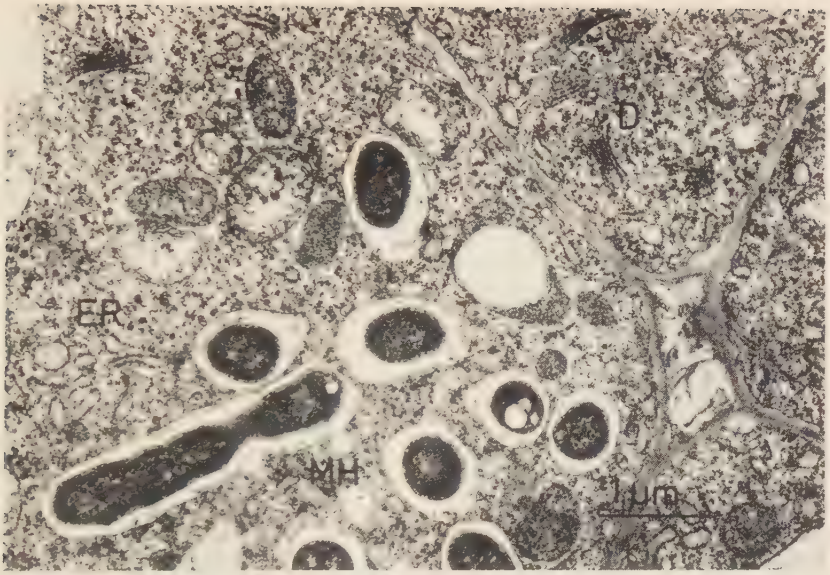


Abb. II

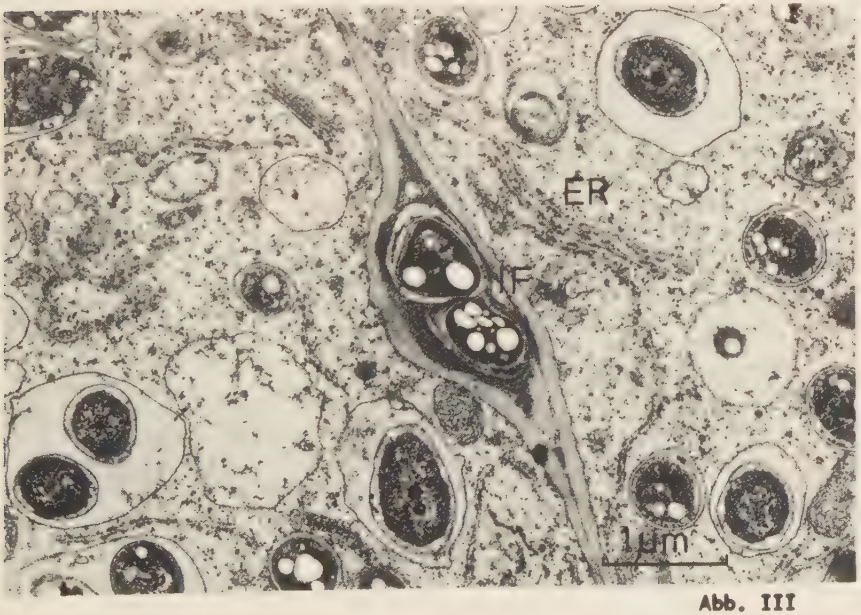


Abb. III

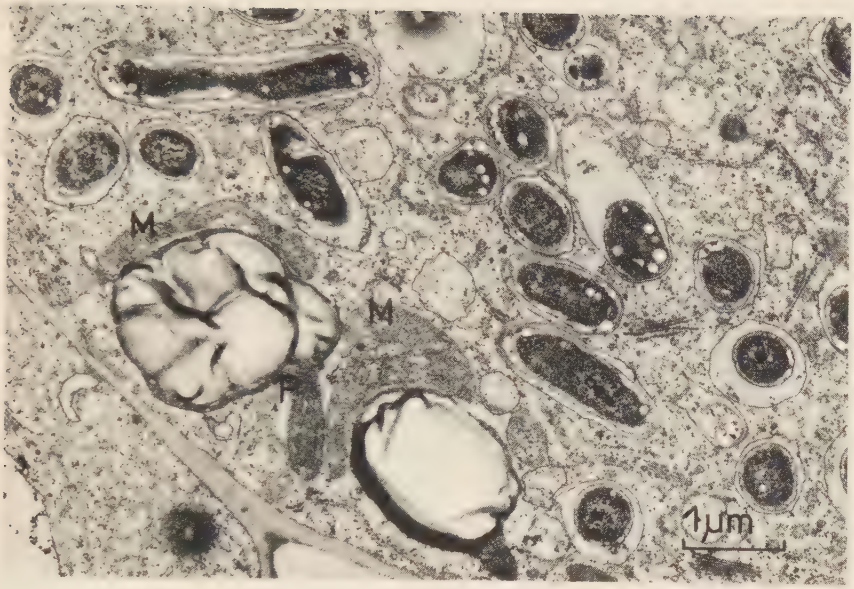


Abb. IV

Abb. V

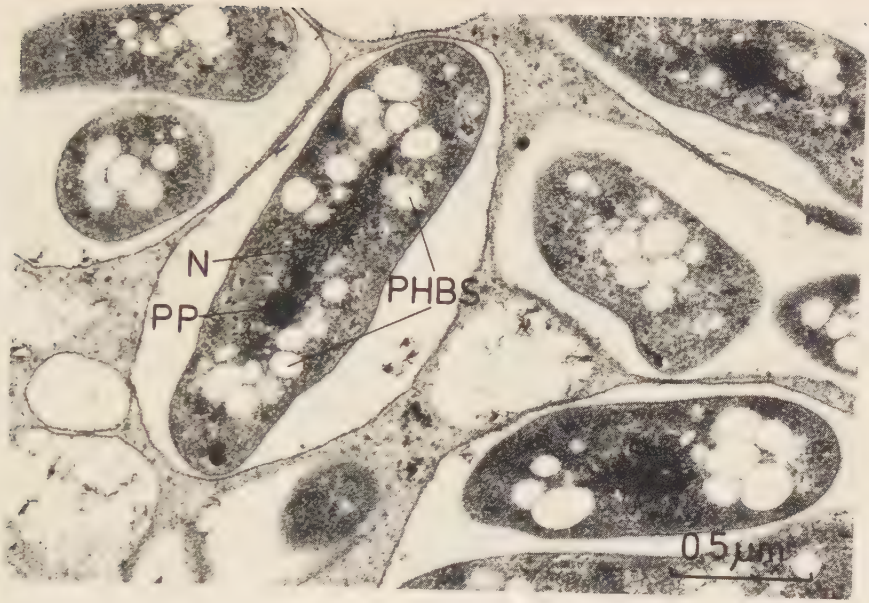


Abb. VI

Abb. VII

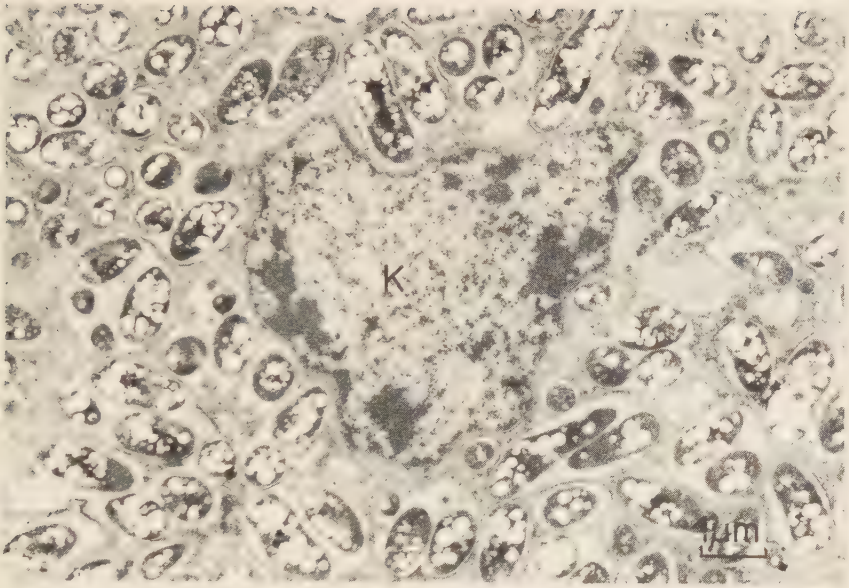


Abb. VIII

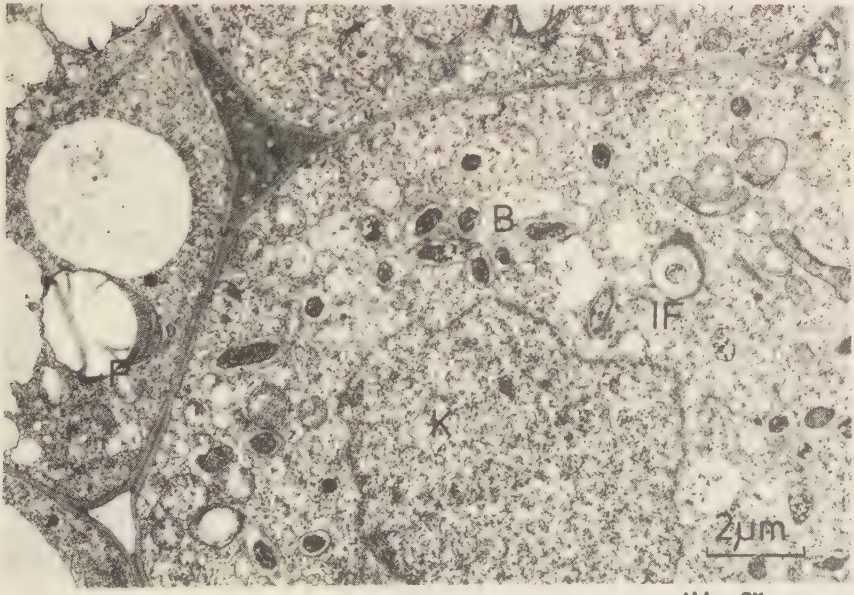


Abb. IX

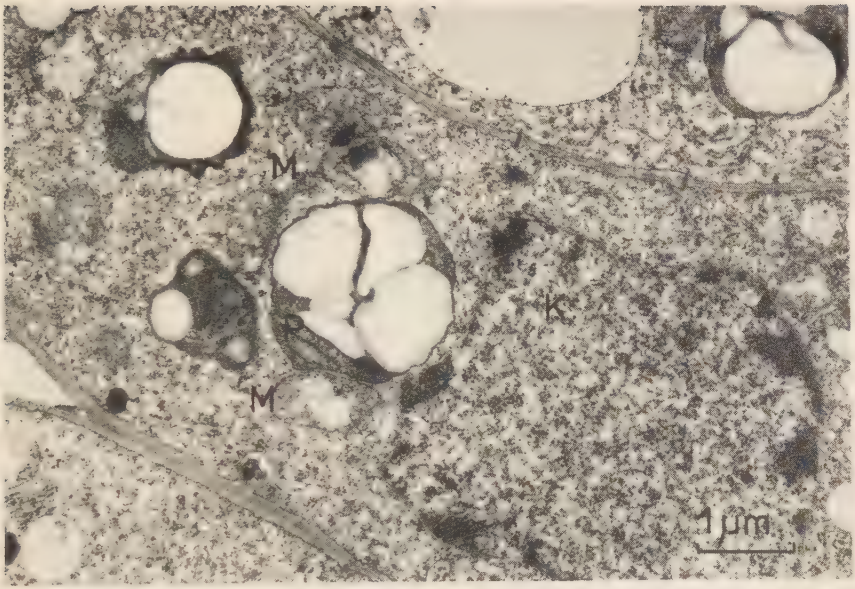


Abb. X

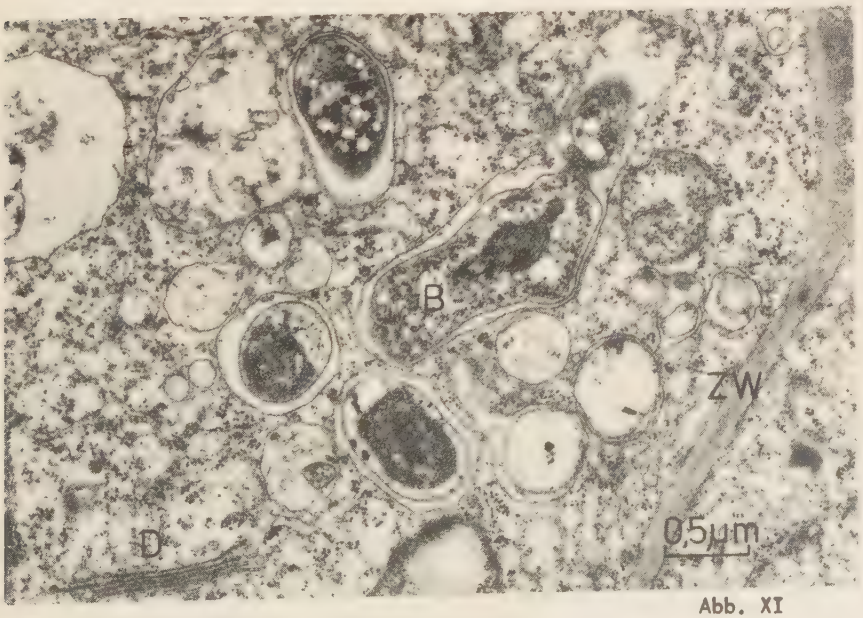


Abb. XI

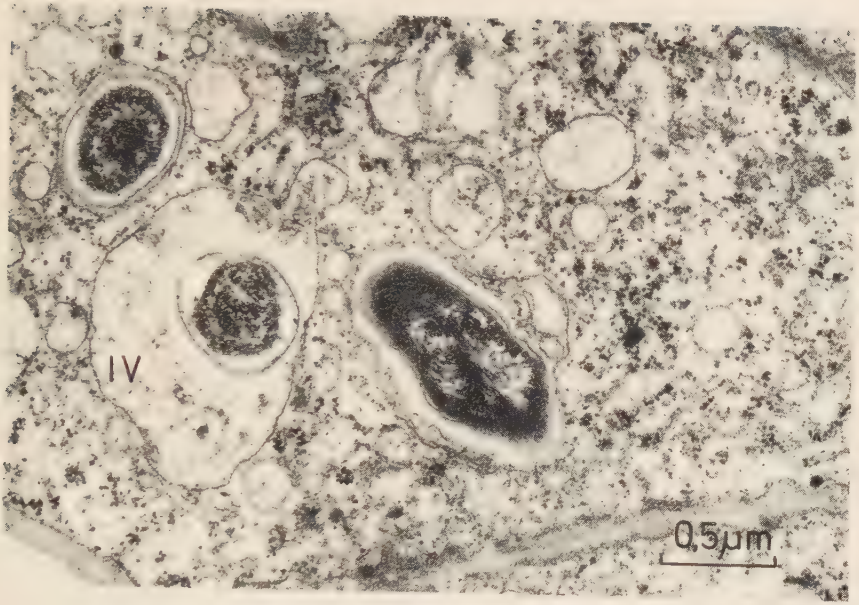


Abb. XII

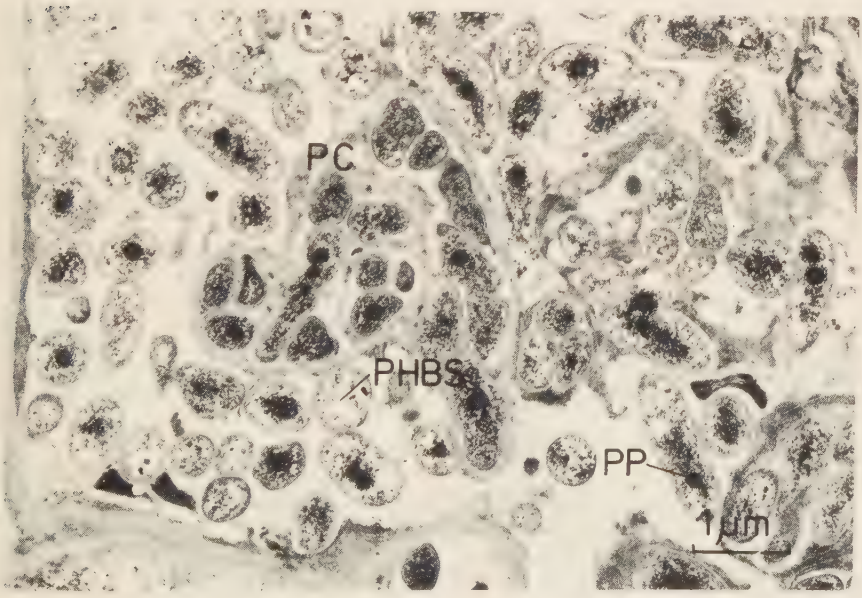


Abb. XIII

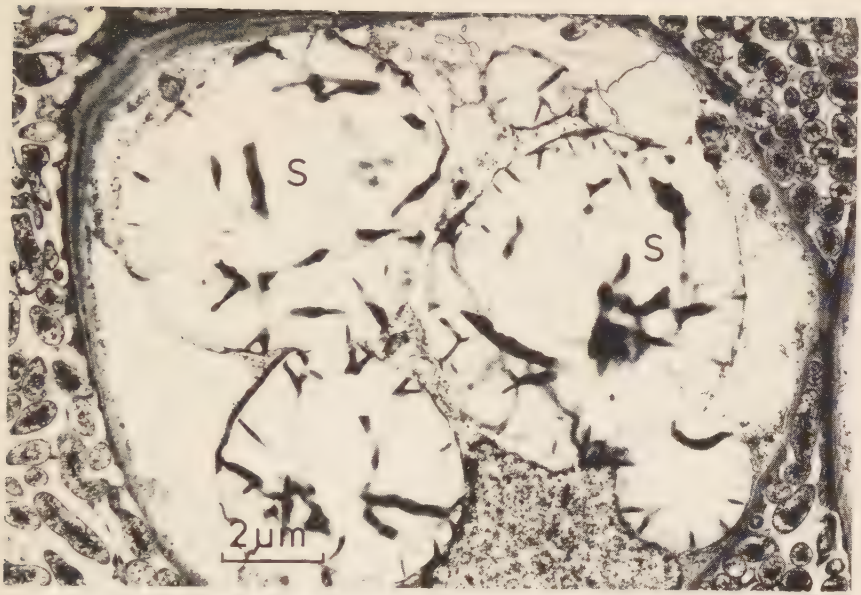


Abb. XIV

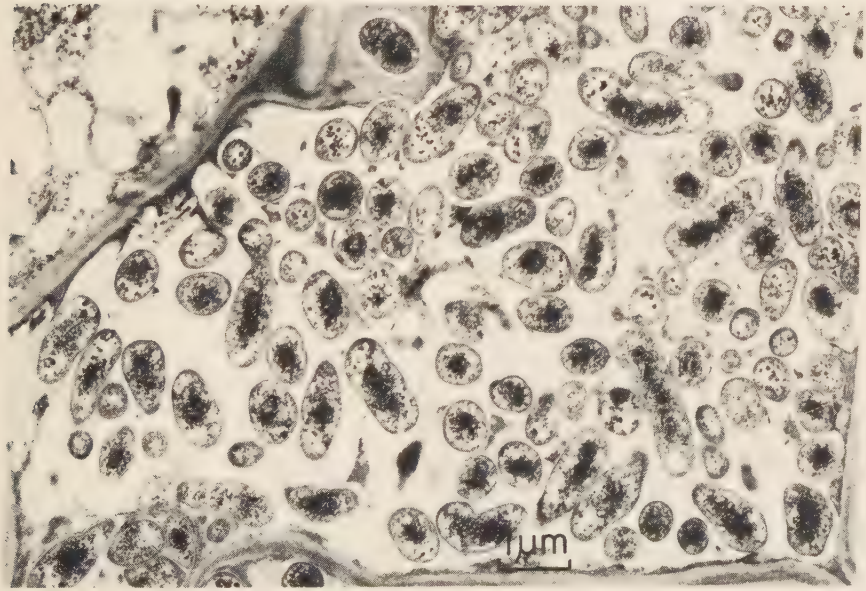


Abb. XV

DANK

Meinem Doktorvater Prof. Dr. D. Werner möchte ich für die Themenstellung und viele Anregungen, besonders aber für seine Großzügigkeit und Geduld während der Verwirklichung dieser Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch Herrn H. Papen, Herrn Dr. P. Scherer, Herrn Dr. E. Zimmermann und den Angehörigen des Fachbereichs Biologie, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben.

LEBENSLAUF

12. 9. 1950	Geburt in Bad Bergzabern (Rheinland-Pfalz) als Sohn des Bankkaufmanns Hans Stripf und seiner Frau Elisabeth, geb. Krauss.
1957 - 1962	Besuch der Grundschule in Karlsruhe (Baden-Württemberg).
1962 - 1970	Schulzeit auf dem neusprachlich und mathematisch-naturwissenschaftlichen Helmholtz-Gymnasium in Karlsruhe mit Englisch und Französisch als Fremdsprachen.
Juni 1970	Erlangung des Abiturs.
1970 - 1972	Studium der Fächer Biologie und Chemie für das Höhere Lehramt an der Universität Fridericiana Karlsruhe.
Sommer 1972	Zwischenprüfung in Karlsruhe abgelegt.
1972 - 1976	Studium der Fächer Biologie, Chemie, Erziehungswissenschaften und ab 1974 Psychologie an der Philipps-Universität Marburg/Lahn.
Februar 1976	Beendigung des Studiums in Biologie, Chemie und Erziehungswissenschaften mit dem Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien. Anfertigung der Staatsexamensarbeit in Biologie: "Untersuchungen über die spezifischen Aktivitäten von Enzymen des N-Stoffwechsels der Symbiose von Glycine max und Rhizobium japonicum in Gewebekultursystemen und Knöllchen."
Ab März 1976	Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. D. Werner am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn.